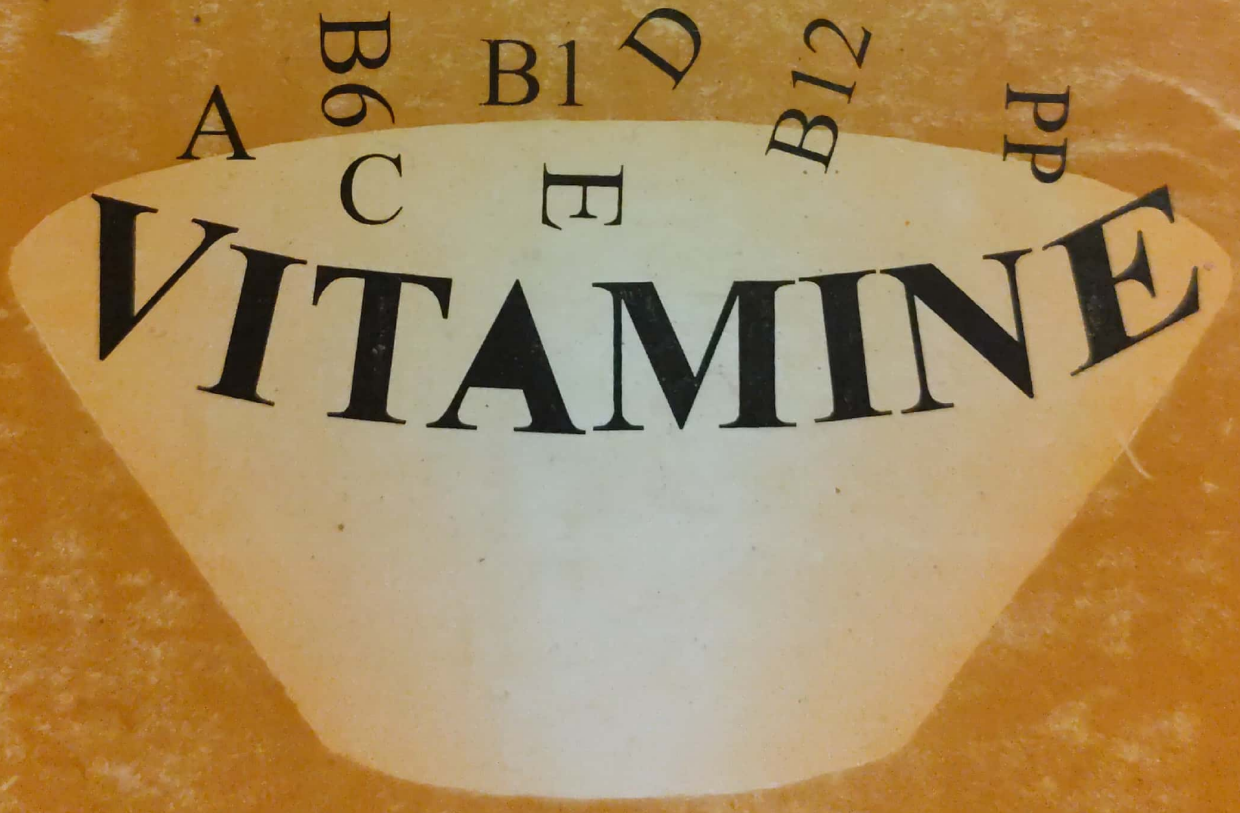
GAVRIL NEAMȚU

SUBSTANȚE NATURALE BIOLOGIC ACTIVE

Volumul 1



EDITURA CERES

N32

Prof. dr. GAVRIL NEAMŢU

SUBSTANŢE NATURALE BIOLOGIC ACTIVE

VOLUMUL I

VITAMINE

Scanned with OKEN Scanner

CUPRINS

Prefață 5
Capitolul 1. Introducere 7

A. VITAMINE LIPOSOLUBILE 24

Capitolul 2. Vitamine A 24
Capitolul 3. Vitamine D 63
Capitolul 4. Vitamine E 98
Capitolul 5. Vitamine K 132
Capitolul 6. Vitamine F 163

B. VITAMINE HIDROSOLUBILE 176

Capitolul 7. Vitamina B_1 179
Capitolul 8. Vitamina B_2 208
Capitolul 9. Vitamina B_6 229
Capitolul 10. Vitamina B_{12} 250
Capitolul 11. Vitamina PP 276
Capitolul 12. Acizi folici sau pteroilglutamici 301
Capitolul 13. Acidul pantotenic 329
Capitolul 14. Biotina 347
Capitolul 15. Acidul paraaminobenzoic 364
Capitolul 16. Alte substanțe cu acțiune vitaminică 373
Capitolul 17. Vitamina C 399
Capitolul 18. Vitaminele P 429
Bibliografie selectivă 441

Scanned with OKEN Scanner

PREFAȚĂ

În perioada actuală, când pe plan național și internațional se pune un accent deosebit pe valorificarea superioară a plantelor de cultură și a celor din flora spontană, a surselor naturale în general, în funcție de compoziția lor chimică, cunoașterea substanțelor active de către personalul de specialitate care lucrează în domeniul agriculturii, horticulturii, silviculturii, biologiei, farmaciei, industriei alimentare etc. se impune ca o cerință de primă importanță. Numai prin cunoașterea compoziției chimice a plantelor și animalelor, a mecanismelor biochimice care stau la baza fenomenelor biologice, normale sau patologice, se vor putea obține soiuri și hibrizi noi de plante, respectiv rase noi de animale, cu potențial de producție ridicat, rezistente la boli și dăunători ușor adaptabile la condițiile nefavorabile ale mediului înconjurător, cu conținut ridicat în substanțe biologic active, care măresc valoarea biologică și comercială a produselor alimentare în care se găsesc.

Apariția unor cărți care să trateze succint structura, proprietățile, răspândirea, metodele de identificare și dozare, metabolismul, rolul și utilizările substanțelor naturale biologic active se impune ca o cerință fundamentală pentru valorificarea superioară a produselor vegetale și animale, atât în industria alimentară, industria farmaceutică, medicină, în folosirea judicioasă a plantelor medicinale în tratamente profilactice și curative, cât și în obținerea unor preparate tonice și dietetice.

Sub genericul Substanțe naturale biologic active, *intenționăm să publicăm în următorii ani cărți cu caracter monografic despre vitamine, enzime, lectine, substanțe imunoactive, hormoni și fitohormoni, glicozide, alcaloizi, pigmenți naturali, uleiuri eterice, taninuri, antibiotice, fitoncide, insecticide vegetale etc. Până în prezent nu a apărut în țara noastră un studiu sistematic asupra substanțelor naturale biologic active și nici cărți cu asemenea tematică.*

Începem studiul substanțelor naturale biologic active cu „Vitaminele", deoarece aceste substanțe sunt larg răspândite în natură și sunt absolut necesare pentru buna funcționare a organismelor animale și vegetale. În lipsa vitaminelor din produsele alimentare apar numeroase afecțiuni metabolice, care afectează grav sănătatea oamenilor și a animalelor. Ele au un rol esențial în creșterea și dezvoltarea normală a diferitelor organisme. Marea majoritate a vitaminelor, care sunt substanțe monomoleculare foarte heterogene sub aspectul compoziției, structurii moleculare și a grupărilor funcționale ce le conțin, sunt biosintetizate

Scanned with OKEN Scanner

numai de plante, dar au un rol foarte important în numeroase procese biologice din organismele animale.

În ultimele decenii nu au apărut în țara noastră cărți de sinteză cu caracter monografic, care să trateze toate vitaminele și antivitaminele sub aspectul structurii, a proprietăților, răspândirii în natură, a rolului și activității biologice a acestora în diferite procese metabolice, utilizările lor în diferite tratamente profilactice și curative etc., fapt ce ne-a determinat să redactăm această carte care pune la dispoziția unui larg cerc de cititori un material cât mai util pentru cunoașterea utilizării diferitelor vitamine în tratamente profilactice și curative pentru menținerea stării de sănătate și activitate la valori cât mai ridicate. În ce măsură dezideratele noastre s-au realizat, rămâne la aprecierea acelora care se vor folosi de această carte.

Dintre lucrările de bază de care ne-am folosit mai mult la redactarea acestei cărți menționăm materialele și cărțile publicate de Firma Hoffman La Roche, Basel, Elveția 1994; Ciulei și colab., 1993; Neamțu și colab. 1993; Cristea Popa și colab. 1991; Enescu și colab. 1990; Abelson și colab. 1990; H. E. Keller 1988; A. E. Lehninger 1987; T. M. Devlin 1986; Bedeleanu și colab. 1985; S. Oeriu 1982; S. P. Colowick 1980; W. D. McCorqucdale și colab. 1980; I. F. Dumitru 1980 și 1970; F. Korte și colab. 1977; I. Gonțea 1971; E. Soru 1959; C. Zaeslein 1982; Grigorescu și colab. 1986; Goodwin și colab. 1988; I. A. Olson 1993; F. Hoffman La Roche 1989; etc., cărți și articole valoroase pe care le recomand să fie consultate și de către cititorii acestei lucrări.

Adresăm mulțumiri Editurii CERES pentru receptivitatea ce a manifestat-o în publicarea acestei cărți, precum și colegilor de la disciplinele de chimie și biochimie a Facultății de Agricultură din Cluj-Napoca, care mi-au oferit un bogat material documentar.

AUTORUL

Scanned with OKEN Scanner

Capitolul 1. INTRODUCERE

1.1. Considerații generale 7
1.2. Hipovitaminoze, avitaminoze, hipervitaminoze 9
1.3. Rolul biochimic al vitaminelor 12
1.4. Scurt istoric 16
1.5. Nomenclatură și clasificare 20

1.1. CONSIDERAȚII GENERALE

Vitaminele sunt substanțe organice cu rol funcțional însemnat, care se găsesc în cantitate mică în alimente și sunt *indispensabile* pentru creșterea și dezvoltarea normală a organismelor. Alături de enzime și hormoni, vitaminele fac parte din grupa catalizatorilor biologici, care contribuie la reglarea și stimularea proceselor metabolice. Plantele, animalele și microorganismele au nevoie, pentru creșterea și dezvoltarea lor, pe lângă constituenții de bază ai materiei vii (glucide, lipide, protide), și de compuși anorganici și substanțe organice cu rol funcțional, care să stimuleze și să regleze procesele metabolice, contribuind în mod efectiv la funcționarea organismului ca un tot unitar. Ele nu au un rol structural și energetic însemnat în organism (NEAMȚU și colab., 1993).

Vitaminele sunt sintetizate în principal de organismele vegetale și de microorganisme și numai în foarte mică măsură de unele specii de animale. Omul și animalele își procură vitaminele din hrană, fie în stare liberă, fie sub formă inactivă, de *provitamine*, care se vor transforma ulterior în organism în vitamine. Organismele animale au nevoie în permanență de vitamine deoarece nu le pot depozita decât în cantități foarte mici. Pentru om și animale, vitaminele sunt în marea lor majoritate metaboliți de origine *exogenă*, spre deosebire de hormoni, care sunt metaboliți de origine *endogenă*. Unele vitamine pot fi sintetizate parțial de om și de animale, mai cu seamă cele care se găsesc în hrană sub forma de provitamine (vitamina A, D) sau care provin din aminoacizi (vitamina PP — provine din triptofan). Microflora din prestomacele ierbivorelor și din tubul digestiv al oamenilor și animalelor sintetizează de asemenea numeroase vitamine (vitamina K, biotina, acidul pantotenic, acidul paraaminobenzoic, acizii folic și folinic etc.), care acoperă în mare parte necesitățile organismelor. Vitaminele pro-

Scanned with OKEN Scanner

duse de flora intestinală sunt considerate tot factori exogeni. Necesităţile organismelor animale privind unele vitamine sunt dependente de natura speciei. Astfel, vitamina C este strict necesară numai pentru om, primate şi cobai, iar restul animalelor o pot sintetiza în cantităţile cerute de organism, astfel încât animalele respective se pot lipsi de aportul exogen al acestei vitamine. Lipsa acidului paraaminobenzoic (PAB) din hrană determină o încetare a creşterii la păsări şi decolorarea părului la şobolani, dereglări metabolice care nu apar la om (BEDELEANU şi colab., 1985).

Vitaminele sunt necesare pentru buna funcţionare a organismului, nu numai omului şi animalelor, dar şi plantelor şi microorganismelor. Rădăcinile plantelor crescute în soluţii nutritive nu se pot dezvolta normal fără unele vitamine, în special cele din complexul B. De asemenea, pentru numeroase microorganisme, vitaminele constituie factori de creştere (NEAMŢU, 1981).

La plante, vitaminele se găsesc în cantitate mai mare în polen, plantule, frunze, fructe, seminţe în stare de germinaţie, drojdie de bere etc.

Conţinutul mediu al principalelor vitamine din fructe şi legume se prezintă în tabelul 1.1.

Tabelul 1.1

Conţinutul mediu al principalelor vitamine din fructe şi legume (după GHERGHI şi colab., 1983, preluat după SOUCI şi colab., 1981), **cu modificări, în mg/100 g produs comestibil**

Specia \ Vitamina	B_1	B_2	B_6	PP	Acid folic	Acid pantotenic	C	E	K	Biotină
0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Afine	0,02	0,02	0,06	0,40	0,01	0,16	22	—	—	0,001
Agrişe	0,02	0,02	0,02	0,25	—	0,20	35	1,0	—	—
Alune	0,39	0,21	0,45	1,35	0,07	1,15	3,0	28,0	—	—
Arahide	0,90	0,15	0,30	15,30	0,05	2,60	—	20,2	—	0,034
Ardei verde	0,06	0,05	0,27	0,33	0,02	0,23	139	0,65	—	—
Banane	0,05	0,06	0,37	0,65	0,02	0,23	12	0,45	—	0,005
Caise	0,04	0,05	0,07	0,77	—	0,29	9,0	0,5	—	—
Căpşuni	0,03	0,05	0,06	0,51	0,02	0,30	64	0,22	0,01	0,004
Cartofi	0,11	0,05	0,21	1,20	0,01	0,40	17	0,09	0,05	—
Castane	0,20	0,21	0,35	0,87	—	0,50	27	7,50	—	0,002
Castraveţi	0,02	0,03	0,03	0,20	0,02	0,24	11	0,20	0,01	0,001
Ceapă	0,03	0,03	0,13	0,20	—	0,17	8,0	0,20	—	—
Ciuperci	0·10	0,44	0,06	5,20	0,02	2,10	5,0	0,08	0,02	0,016
Coacăze negre	0,05	0,04	0,08	0,28	—	0,40	177	1,0	—	0,002
Conopidă	0,30	0,10	—	0,60	0,05	1,01	70	0,09	0,01	0,001
Fasole boabe	0,46	0,16	0,28	2,10	0,13	0,98	3,0	2,30	—	—
Fasole verde	0,08	0,12	0,28	0,60	0,04	0,50	20	0,28	0,02	0,007
Grapefruit	0,05	0,03	0,01	0,20	0,01	0,21	45	0,25	—	—
Gulii	0,05	0,05	0,12	1,80	0,01	0,10	63	—	—	—
Gutui	0,03	0,03	—	0,20	—	—	13	—	—	—
Lămâi	0,05	0,02	0,06	0,17	0,01	0,27	53	0,80	—	—
Mandarine	0,07	0,02	0,07	0,20	0,02	—	31	—	—	—
Măsline	0,03	0,08	0,50	—	0,02	—	—	—	—	—
Mazăre	0,30	0,16	0,16	2,40	0,03	0,72	25	3,0	0,02	0,005
Mere	0,04	0,03	0,05	0,30	—	0,10	12	0,57	—	0,004
Migdale	0,22	0,62	0,06	4,18	0,05	0,58	3,0	26,10	—	—

Scanned with OKEN Scanner

Tabelul 1.1 (continuare)

0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Mure	0,03	0,04	0,05	0,40	—	0,22	17	9,70	—	—
Nuci	0,34	0,12	0,87	1,00	0,08	0,82	3,0	24,70	—	0,02
Pătârnac	0,08	0,13	0,11	0,09	0,06	0,50	18	1,0	—	—
Pătrunjel	0,12	0,08	0,20	2,00	—	0,03	35	1,80	—	—
Pepeni	0,05	0,06	0,11	0,05	0,04	0,40	9,0	0,10	—	—
Pere	0,03	0,04	0,02	0,22	0,01	0,06	5,0	0,43	—	—
Piersici	0,03	0,05	0,03	0,85	—	0,14	10	0,60	—	0,002
Praz	0,10	0,06	0,25	0,50	—	—	30	2,0	—	—
Portocale	0,08	0,04	0,05	0,30	0,02	0,24	50	0,24	—	0,002
Prune	0,07	0,04	0,04	0,44	—	0,18	5,0	0,80	—	—
Ridichi	0,03	0,03	0,06	0,20	0,02	0,18	29	—	—	—
Salată	0,06	0,08	0,05	0,30	0,04	0,11	13	0,39	0,20	0,002
Sfeclă roşie	0,02	0,04	0,05	0,20	0,09	0,12	10	0,10	—	—
Spanac	0,11	0,23	0,22	0,60	0,08	0,25	52	2,50	0,35	0,007
Sparanghel	0,11	0,12	0,06	1,00	0,09	0,62	21	2,50	0,04	0,002
Struguri	0,05	0,03	0,07	0,23	0,01	0,06	4,0	—	—	0,002
Ţelină	0,04	0,07	0,20	0,90	0,01	—	8,0	2,60	0,10	—
Tomate	0,06	0,04	0,10	0,50	0,04	0,31	24	0,49	0,63	0,004
Usturoi	0,20	0,08	—	0,60	—	—	14	0,10	—	—
Varză albă	0,05	0,04	0,11	0,32	0,08	0,26	46	0,02	0,15	—
Varză roşie	0,07	0,05	0,15	0,43	0,04	0,32	50	2,50	1,50	0,002
Vinete	0,04	0,05	0,09	0,60	0,03	0,23	5,0	0,03	—	—
Vişine	0,05	0,06	—	0,40	—	—	12	—	—	—
Zmeură	0,02	0,05	0,08	0,30	—	0,30	15	1,40	—	—

Necesarul de vitamine pentru omul sănătos este asigurat atât prin alimente, cât şi de flora intestinală. Este bine ca raţiile alimentare să fie cât mai variate şi mai bine echilibrate între diferiţi componenţi nutritivi atât de origine animală (lapte, carne, unt, ouă etc.) cât şi vegetală (legume, fructe proaspete, cereale etc.).

Conţinutul principalelor vitamine din unele produse alimentare se prezintă în tabelul 1.2.

Aprovizionarea bună a organismului cu vitaminele necesare îndeplinirii funcţionării normale a proceselor metabolice, a creşterii şi dezvoltării armonioase a organismului, se poate stabili prin determinarea conţinutului vitaminelor din sânge şi ser. În tabelul 1.3. se prezintă conţinutul principalelor vitamine din plasma şi serul omului sănătos.

1.2. HIPOVITAMINOZE, AVITAMINOZE, HIPERVITAMINOZE

Insuficienţa sau lipsa vitaminelor din alimente determină la om apariţia unor dereglări metabolice progresive, a unor boli carenţiale, de la forme uşoare până la forme grave, care pot determina moartea organismului. Aceste stări carenţiale se numesc *hipovitaminoze*, la o insuficienţă a vitaminelor din organism, sau *avitaminoze*, în lipsa unor vitamine. Tratamentele cu vitamine naturale sau de sinteză în stările carenţiale se impun cu necesitate. Ele sunt eficiente, întrucât bolile carenţiale sunt procese reversibile. Bolile provocate de lipsa concomitentă a mai multor vitamine din organism poartă denumirea de *poliavitaminoze*, care apar mai frecvent la oameni spre sfârşitul iernii, din cauza

Scanned with OKEN Scanner

Tabelul 1.2

Conținutul principalelor vitamine din unele produse alimentare (după ZASLEIN, 1982), **cu modificări, din 100 g parte edibilă**

Vitamine / Produs alimentar	A U.I.	B_1 mg	B_2 mg	B_6 mg	PP mg	Acid pantotenic mg	Acid folic µg	C mg
Arahide	360	0,3	0,13	0,3	17	21	57	—
Brânză Emmental	1 140	0,05	0,33	0,09	0,1	0,5	—	0,5
Carne de vițel	—	0,18	0,27	0,2	6,3	0,9	5,0	—
Cartofi proaspeți	—	0,11	0,04	0,2	1,2	0,3	6,0	20
Cireșe	1 000	0,05	0,06	0,05	0,3	0,08	6,0	10
Cod (pește)	—	0,06	0,07	0,2	2,2	0,12	1,0	2,0
Cotlet de porc	—	0,8	0,2	0,5	4,3	0,4	2,0	—
Fasole boabe	640	0,32	0,15	0,18	2,5	0,3	25	27
Ficat de vită	22 500	0,3	2,7	1,2	17	10	50	32
Grapefruit suc	10	0,03	0,02	0,014	0,2	0,16	1,0	45
Lapte proaspăt	140	0,04	0,15	0,05	0,07	0,33	5,0	1,0
Lăptucă	970	0,06	0,07	0,07	0,3	0,1	20	8,0
Mazăre	600	0,07	0,1	0,14	0,5	0,2	28	19
Mere	90	0,04	0,02	0,03	0,1	0,1	2,0	5,0
Morcovi	11 000	0,06	0,06	0,12	0,6	0,3	8,0	6,0
Ouă	1 180	0,12	0,34	0,25	0,1	1,6	5,0	—
Portocale	200	0,1	0,03	0,03	0,2	0,2	5,0	50
Portocale suc	100	0,07	0,02	0,03	0,2	0,14	2,0	50
Praz	50	0,06	0,04	—	0,5	—	—	18
Pui	30	0,1	0,2	0,5	7,0	0,8	3,0	2,5
Prune	250	0,07	0,04	0,05	0,05	0,5	2,0	6,0
Spanac	8 100	0,1	0,2	0,2	0,6	0,3	75	51
Struguri	100	0,05	0,02	0,1	0,3	0,08	6,0	4,0

Tabelul 1.3

Conținutul mediu al vitaminelor din plasmă sau ser la omul sănătos (după ZASLEIN, 1982)

Vitamine	Conținut mediu
Vitamina A	32,4 µg/100 ml
Vitamina B_1	2,1 µg/100 ml
Vitamina B_2	3,2 µg/100 ml
Vitamina B_6	4,4 µg/100 ml
Nicotinamida	75 µg/100 ml
Acid pantothenic	25 µg/100 ml
Biotină	30 ng/100 ml
Acid folic	0,9 µg/100 ml
Vitamina B_{12}	40 ng/100 ml
Vitamina C	0,7 mg/100 ml
Vitamina D	200 U.I./100 ml
Vitamina E	1,0 mg/100 ml

Notă: Conținutul vitaminelor variază în funcție de metodele de determinare utilizate

Scanned with OKEN Scanner

unui consum mai îndelungat de alimente uscate, cu conținut scăzut de vitamine și a unui consum redus de fructe și legume în stare proaspătă.

În stări de hipovitaminoză, la început apar simptome generale de slăbire a organismului, scăderea funcțiilor normale ale întregului organism. Se produce o reducere a capacității muncii fizice și intelectuale, o stare de apatie și indispoziție generală. Dacă starea de hipovitaminoză se menține un timp mai îndelungat, apar simptomele caracteristice fiecărei vitamine; xeroftalmia în insuficiența sau lipsa vitaminelor A, rahitismul în insuficiența sau lipsa vitaminelor D, scorbutul în insuficiența sau lipsa vitaminei C, hemoragii în insuficiența sau lipsa vitaminei K etc.

Stările de hipovitaminoză și mai rar de avitaminoză pot să apară la om și la unele animale, fie datorită unui aport insuficient de vitamine sau provitamine în alimente, fie apariției unor deficiențe în absorbția acestora, a unor dereglări privind transformarea provitaminelor în vitamine, a diminuării capacității de depozitare în celule și țesuturi. Trebuie luat în considerare dezechilibrul dintre aport și utilizare, reacțiile de sinergism și antagonism dintre vitamine și diferiți compuși (medicamente, antivitamine etc.) (DUMITRU, 1976; SORU, 1959, CRISTEA și colab., 1991).

După cauzele care le determină, bolile carențiale (hipo- și avitaminoze) numite și *boli de nutriție,* pot fi *primare,* datorită lipsei de aport vitaminic și *secundare,* sau condiționate de factori determinați de individ.

În dereglările primare se includ carențele determinate de lipsa reală a vitaminelor din alimente, fie subnutriției, alimentației deficitare sau degradării vitaminelor din alimente prin fierbere, conservare, prelucrare etc., fie tulburărilor de absorbție, degradarea florei intestinale, administrarea unor medicamente cu acțiune antivitaminică (sulfamide, antibiotice), dereglări în transformarea provitaminelor în vitamine, existența în alimente a unor antivitamine (ENESCU și colab., 1990).

Hipo- și avitaminozele secundare apar când organismul necesită un aport mărit de vitamine, în perioadele de creștere intensivă, graviditate, lactație, efort fizic prelungit, alcoolism cronic, boli infecțioase etc., iar consumul de alimente nu asigură necesarul de vitamine. In aceste stări fiziologice mai deosebite, pe baza analizei conținutului de vitamine din sânge, se impune îmbunătățirea alimentației cu surse de vitamine sau efectuarea unor tratamente cu vitamine sintetice. În administrarea vitaminelor, trebuie să se țină seama de corelațiile care se stabilesc între activitatea acestora cu alte tipuri de substanțe. Astfel, tratamentul cu hidrazida acidului izonicotinic (HIN) sau cu acid paraaminosalicilic (PAS), mărește necesitățile în vitamina C. În bolile infecțioase, cresc cerințele organismului față de vitamina A, considerată sub acest aspect ca vitamină *antiinfecțioasă.* Un regim alimentar bogat în glucide, necesită un spor de vitamina B_1. La același regim alimentar, sărac în vitamine, pot apărea la oameni dereglări și simptome diferite, în funcție de antecedente, de rezistența persoanelor, de *„individualitatea biochimică"* a organismului etc. (BEDELEANU și colab., 1985).

Printr-un consum alimentar îndelungat, bogat în vitamine și provitamine (ficat de pește oceanic, untură de pește, suc de morcovi etc.),

Scanned with OKEN Scanner

sau în urma unor tratamente cu consum exagerat de vitamine, apar de asemenea dereglări metabolice, denumite *hipervitaminoze*, cu simptome similare avitaminozelor, iar în cazuri mai grave se produc *intoxicații cu vitamine*. Hipervitaminozele în fazele incipiente sunt reversibile. Există persoane care manifestă intoleranță față de unele vitamine (vitamina B_1), iar administrarea acestora la gravide pot determina efecte teratogene cu apariția de malformații la copii.

Un conținut mare de vitamina E, de peste 1 000 U.I./zi, poate determina apariția de hemoragii, datorită anihilării acțiunii vitaminei K. În alcătuirea rațiilor alimentare trebuie să se țină seama atât de interacțiunea compușilor chimici, de echilibrarea constituenților de bază ai materiei vii, cât și de corelațiile metabolice, de posibilitatea înlocuirii reciproce a substanțelor nutritive și de balanța energetică a organismului (legea izodinamiei) (OERIU, 1974; LEHNINGER, 1987).

1.3. ROLUL BIOCHIMIC AL VITAMINELOR

Vitaminele au în organismele vegetale și animale un rol multiplu și complex, fiind factori alimentari *„esențiali"*, absolut necesari tuturor organismelor. Ele se mai numesc și *„factori coenzimatici"*, deoarece un număr însemnat de vitamine (în mod deosebit cele din complexul B) îndeplinesc rolul de coenzime, iar altele sunt activatori enzimatici, justificându-se și în acest fel încadrarea vitaminelor între catalizatorii biologici (NEAMȚU, și colab., 1982).

Astfel, vitamina B_2 este coenzima flavinenzimelor, vitamina B_1 este coenzima decarboxilazelor, vitamina B_6 prin fosforilare formează coenzima transaminazelor, vitamina PP formează partea activă a coenzimelor NAD^+ și $NADP^+$, acidul pantotenic intră în constituția HSCoA, indispensabilă metabolizării acizilor grași, biotina formează coenzima carboxilazelor etc. În transformilări și transmetilări un rol important îl au vitaminele folinice, iar inozitolii îndeplinesc rolul de activatori ai amilazelor. Vitamina C, pe lângă numeroase roluri și funcții biochimice ce le are în organism, determină și activarea esterazelor (BODEA și colab., 1964, NEAMȚU și colab., 1989). Vitaminele participă la realizarea unor importante procese metabolice absolut necesare creșterii și dezvoltării organismelor. Unele vitamine formează în celule importante *sisteme de oxidoreducere*, care iau parte în numeroase procese metabolice ale glucidelor, lipidelor, protidelor și a altor compuși, reglează potențialul de oxido-reducere din celule, contribuie la transportul hidrogenului pe cale neenzimatică (vitamina C, E, K, B_2 etc.). Formele active ale vitaminelor și a derivaților acestora precum și funcțiile lor metabolice se prezintă în tabelul 1.4.

Efectul unor vitamine în diferite procese metabolice este frânat și chiar anulat de unii *antimetaboliți*. Astfel, efectul acidului paraaminobenzoic (PAB) în creșterea microorganismelor este inhibat de sulfamide ($H_2N\text{-}C_6H_4\text{-}SO_2NH_2$), care funcționează ca antimetaboliți, denumiți și *antivitamine*.

Relația dintre acidul paraaminobenzoic și sulfamide este reciprocă, reversibilă, iar anihilarea efectului unuia asupra celuilalt, depinde în principal de concentrație. Acțiunile reciproce dintre vitamine și anti-

Scanned with OKEN Scanner

Tabelul 1.4

Tabel sinoptic cu formele active ale vitaminelor şi derivaţilor acestora şi cu funcţiile lor metabolice (după ZAESLEIN, 1982, cu modificări)

Vitamina	Forme active şi derivaţi	Rol şi funcţii metabolice
Vitamina A (Retinol)	Trans-retinol 11-cis-retinal (neo-retinal b) Acid retinoic	Stimulează metabolismul proteinelor din celulele tuturor organelor de origine ectodermă (piele, mucoase, epiteliu gonadal, epiteliu senzorial etc.) Contribuie la formarea pigmenţilor vizuali (rodopsina şi iodopsina), cromoproteide în care gruparea prostetică este 11-cis-retinal Formele de depozit în ficat sunt esterii retinil cu acizii graşi puternic legaţi de proteine. Acidul retinoic are o activitate vitaminică parţială, influenţând creşterea şi funcţionarea pielii
Vitamina D (Calciferol)	1α,25-Dihidroxi-colecalciferol,25-hidroxi-colecalciferol	Reglează echilibrul dintre conţinutul calciului, magneziului şi fosforului şi influenţează metabolismul acidului citric Controlează absorbţia calciului şi incorporarea acestuia în sistemul osos
Vitamina E (Tocoferol)	Tocoferoli liberi	Are acţiune fiziologică antioxidantă şi exercită o acţiune stabilizatoare asupra hormonilor, enzimelor, altor vitamine şi lipide. Stabilizează membranele celulare şi lizozomale şi împiedică formarea lipoperoxidazelor. Joacă rol însemnat în respiraţia intracelulară
Vitamina K (Fitomenadionă)	Vitamina K_1 liberă Vitamina K_2	Factori esenţiali pentru biosinteza protrombinei în ficat. Indispensabile pentru biosinteza factorilor de coagulare a sângelui. Au rol însemnat în transportul electronilor în lanţul respirator
Vitamina B_1 (Tiamină)	Tiaminpirofosfat (TPP)	Coenzimă a piruvatdecarboxilazei şi a 2-oxo-glutaratdehidrogenazei, jucând un rol însemnat în decarboxilări (aminoacizi, cetoacizi, hidroxiacizi, derivaţi glucidici) şi a oxidării 2-oxo-acizilor. Coenzimă a transcetolazelor jucând un rol important în transferul grupelor aldehidice în ciclul pentozofosfaţilor
Vitamina B_2 (Riboflavină)	Riboflavin-5'-fosfat (FMN) FAD	Intră în constituţia flavinmononucleotidelor (FMN) şi a flavindinucleotidelor (FAD) care sunt coenzime ale dehidrogenazelor aerobe (flavinice). Realizează transportul de hidrogen în metabolismul aminoacizilor, acizilor graşi (NADH-citocrom-C-reductaza, NADPH-citocrom-C-reductaza, aminoacidoxidaza, diaminooxidază, acid gras-CoA-dehidrogenaza, succinat-dehidrogenaza, glutation-reductaza
Vitamina B_6 ((Piridoxină)	Piridoxal-5'-fosfat	Coenzimă a aminoacid-decarboxilazelor, aminotransferazelor, hidrolazelor, fosforilazelor, cistationazelor, având prin aceste funcţii o importanţă cardinală în metabolismul proteinelor. Joacă un rol important în sinteza aminelor biogene şi în metabolismul cerebral
Nicotinamida	Nicotinamiddinucleotid (NAD^+) Nicotinamiddinucleotidfosfat (NADPH)	Îndeplinesc rolul de coenzime în numeroase dehidrogenaze, specificitatea acestora fiind determinată de partea proteică a enzimelor. Transferă ionul de hidrogen în metabolismul intermediar, principalul acceptor fiind flavo-enzimele, mai cu seamă în oxidarea fosforolitică. Funcţia de coenzimă este exercitată preferenţial de NADPH

Scanned with OKEN Scanner

Tabelul 1.4 (continuare)

Vitamina	Forme active și derivați	Rol și funcții metabolice
Acidul pantotenic	Coenzima A (CoA)	Joacă un rol cheie în sistemul enzimatic al aciltransferazelor, principalii acceptori fiind aminoacizi, amine, glucozamine și fosfatide. Transferă restul de acetil-CoA ($CH_3-CO\sim SCoA$) format în decarboxilările oxidative ale acidului piruvic, în oxidările finale ale metabolismului glucidelor, cu formare de acid oxalilacetic și acid piruvic. Degradarea și biosinteza acizilor grași sub formă legată de acil-CoA stimulează biosinteza acizilor grași prin alungirea catenei carbonice, biosinteza fosfatidelor și a sterolilor
Biotina	1'-N-carboxibiotină	Este gruparea prostetică a carboxilazelor cum sunt acetil-CoA-carboxilază, piruvat-carboxilaza, propionil-CoA-carboxilaza și β-metilcrotonil-CoA-carboxilaza, care ia parte la sinteza endogenă a acizilor grași, în gluconeogeneză și la degradarea aminoacizilor
Acid folic (Acid pteroilglutamic)	Acid 5,6,7,8-tetra hidrofolinic, formil, forimino sau metil substituit în poziția 5 și/sau 10	Constiuent al așa numitelor enzime folate. Transferă unități C_1 active în reacții de metilare și hidroximetilare cu formare de „formiat activ" și „hidroximetil activ". Transferă glicina în glutamat sau serină, a citozinei în hidroximetil-citozină, a homocisteinei în metionină, a acidului deoxiuridilic în acid timidilic și a uracilului în timidină
Vitamina B_{12} (Cianocobamidă)	5-deoxiadenozilcobamina (Coenzima B_{12})	Formează grupul prostetic al metilmalonil-CoA-izomeraza și astfel este necesară conversiei acidului propionic în acid succinic. Participă la biosinteza grupărilor metil care sunt apoi transferate la acceptorii de metil prin procese de transmetilare. Participă la biosinteza nucleoproteidelor în țesuturi cu diviziune celulară rapidă (eritropoieza în măduva oaselor, mucoasa tubului digestiv etc.)
Vitamina C (Acid ascorbic)	Probabil monodehidroacid ascorbic	Compus redox cu proprietăți reversibile în transportul ionilor de hidrogen și a electronilor. Se implică în procese de hidroxilare. Are rol important în biosinteza corticosteroizilor și catecolaminelor Acidul ascorbic prin transformare în acid dehidroascorbic și invers, reglează potențialul oxidoreducător din celule și asigură transportul hidrogenului pe cale neenzimatică

metaboliți constituie mecanisme principale care stau la baza *chimioterapiei moderne.*

Este necesar să se cunoască interacțiunile dintre diferite vitamine, dintre vitamine și hormoni, vitamine și medicamente, care se realizează prin efecte sinergice, de potențare a activității lor, sau de scădere și diminuare a efectului unor vitamine, hormoni și medicamente (BEDELEANU și colab., 1985).

Vitamina C stimulează absorbția fierului, iar vitamina E mărește stabilitatea acizilor grași esențiali. Un conținut mare de vitamine A și E inhibă absorbția vitaminei K și declanșează apariția hemoragiilor.

Scanned with OKEN Scanner

Antibioticele cu spectru larg reduc sau distrug flora intestinală afectând grav biosinteza vitaminei K și a unor vitamine din complexul B. Administrarea colestiraminei inhibă absorbția vitaminelor liposolubile, iar medicamentele cumarinice inhibă acțiunea vitaminei K (GONȚE, 1971).

La plante, pe lângă participarea vitaminelor în numeroase procese metabolice, ele stimulează procesele de fecundare, fapt ce explică conținutul lor mai ridicat în polen. Vitaminele ridică valoarea biologică și alimentară a fructelor și a legumelor. Unele vitamine iau parte activă în procesul de fotosinteză, în creșterea și dezvoltarea organismelor vegetale.

Din punct de vedere chimic, vitaminele sunt substanțe micromoleculare foarte heterogene sub aspectul structurii moleculare. Ca element comun se poate remarca prezența unor grupări funcționale libere sau esterificate în molecula lor. Unele vitamine conțin grupări hidroxilice (vitamina A_1), chinonice (vitamina K), nuclee heterociclice (vitamina E), mono și biciclice (biotina), altele sunt lactone (vitamina C), amide (vitamina PP), esteri (acidul pantotenic) etc.

Vitaminele, în special cele din grupul B, se caracterizează printr-o mare specificitate structurală. Dacă se produc unele mici modificări în structura lor moleculară, compușii care se obțin nu prezintă activitate vitaminică și pot chiar bloca activitatea vitaminelor. Acești compuși, care au o structură moleculară similară vitaminelor, se numesc *antivitamine* sau vitamine antagoniste.

Vitaminele liposolubile iau parte în procesele metabolice, fie sub formă moleculară ca atare, în stare liberă sau esterificate, fie sub formă de metaboliți, cum sunt compușii retinoidici, în cazul vitaminei A sau dehidrosterolii în cazul vitaminelor D.

În cazul vitaminei C nu se cunoaște rolul de coenzimă a acestei vitamine, dar ia parte în procesele de hidroxilare, probabil sub formă de monodehidro- acid ascorbic.

Cu toate că efectele fiziologice ale prezenței și mai ales ale absenței unor vitamine din organism sunt relativ bine cunoscute, mai puțin cunoscut este mecanismul prin care diferitele vitamine influențează și reglează procesele metabolice.

În celule și țesuturi, alături de vitamine, există și alți compuși naturali, numiți *vitagene,* care influențează creșterea și dezvoltarea organismelor, dar care intră în structura celulelor sau servesc ca substanțe energetice. Din această grupă fac parte acizii grași esențiali (AGE), aminoacizi (AAE), betaina, colina, acizii lipoici, acidul panganic (vitamina B_{15}), procaina (vitamina H_3, care este principiul activ al gerovitalului și aslavitalului) etc. Vitagenele, în stări carențiale, determină dereglări metabolice similare hipovitaminozelor. Acești compuși se găsesc în cantitate mult mai mare în alimente decât vitaminele, iar necesarul pentru om este de ordinul gramelor/zi și nu a µg sau mg/zi, ca și în cazul vitaminelor.

Substanțele naturale sau de sinteză înrudite structural și funcțional cu vitaminele, se numesc *vitamere.* În această clasă se pot încadra retinolul, acidul retinoic, acidul pimelic, naftochinone, compuși heterociclici benzofuranici, benzopiranici etc. Vitamerele nu îndeplinesc în în-

Scanned with OKEN Scanner

tregime caracteristicile vitaminelor, iar utilizarea acestui termen poate determina confuzii în definirea rolului lor biochimic specific.

În plante și animale, s-au identificat unele substanțe organice care au o acțiune biochimică și fiziologică asupra vitaminelor. Aceste substanțe se numesc *antivitamine*.

Unele antivitamine prezintă o structură moleculară similară cu cea a vitaminelor pe care le inhibă, sau cu o parte a moleculei acestora. Așa este cazul acidului paraaaminobenzoic cu sulfamidele, sau a vitaminei PP cu acetilpiridina etc. Alte antivitamine degradează structura moleculară a unor vitamine. Așa este *tiaminaza*, care degradează molecula vitaminei B_1, *lipoxidazele*, care inactivează provitaminele A, *ascorbaza*, care oxidează vitamina C etc. *Avidina*, care este o proteină din albușul de ou, inactivează biotina prin blocarea părților active și formarea unor compuși inactivi.

Există de asemenea compuși care reacționează chimic cu vitaminele sau care inhibă biosinteza acestora. Acțiunea antivitaminelor este utilizată în chimioterapie și în cercetări chimice pentru realizarea unor avitaminoze clare, pure (BEDELEANU, 1985).

1.4. SCURT ISTORIC

Istoria vitaminelor constituie unul din cele mai importante episoade din istoria biochimiei, care a avut o influență profundă asupra sănătății oamenilor, precum și asupra înțelegerii proceselor biochimice din organismele vii.

Prima vitamină a fost descoperită de CAZIMIERZ FUNK în 1911, care a reușit să izoleze din tărâțele de orez o substanță ce vindecă boala beri-beri, numită de autor *vitamină*, adică amină vitală. I s-a dat numele de vitamină deoarece substanța respectivă (vitamina B_1) conține azot aminic și era considerată indispensabilă vieții. Astăzi se cunosc un număr însemnat de vitamine ce nu conțin azot în molecula lor.

În descoperirea vitaminelor se pot stabili mai multe etape în raport cu cunoașterea structurii, a proprietăților, rolului și a bolilor care apar în stări de hipo- sau de avitaminoze (BEDELEANU, 1985).

a. **Etapa observării și descrierii unor boli** descoperite ulterior a fi datorate unor hipo- sau avitaminoze.

Unele din bolile care apar în carență de vitamine erau cunoscute și descrise din timpuri străvechi. Astfel, chinezii au descris boala beri-beri, cu aproximativ 2500 de ani înaintea erei noastre, iar în papirusul „Ebber" de acum 3520 de ani, s-a descris pierderea vederii în lumină crepusculară, care s-a dovedit ulterior a fi determinată de lipsa vitaminei A. Manifestările scorbutului (avitaminoza C) au fost descrise de părintele medicinei, Hippocrate și de numeroși istorici încă din secolul IV î.e.n. Această boală apărea frecvent la navigatorii care efectuau călătorii îndelungate. Numele de scorbut i-a fost atribuit de Enricus Cordus, în 1543, în evul mediu. Tratamentul empiric al acestei boli utiliza plante verzi, conifere, citrice, etc., care s-au dovedit ulterior a fi bogate în vitamina C.

Scanned with OKEN Scanner

În scrierile istorice ale lui Plinius, apar menţiuni privind îmbolnăviri de scorbut la soldaţii romani datorită nutriţiei. Îmbolnăviri similare s-au semnalat şi la marinarii lui Vasco da Gama în 1498, iar în expediţia lui *Napoleon* în Egipt s-au semnalat 50.000 de cazuri de scorbut (DUMITRU, 1970).

Simptomele reumatismului au fost descrise la om de *B. Resner* în 1582, *D. Whistler* în 1645 şi de *F. Glisson* în 1650, sub denumirea de *„boala englezească"* (avitaminoza D), cu recomandarea consumării unturii de peşte. Pelagra a fost descrisă ca o boală răspândită în Spania în secolul XVII, fiind denumită de *Gaspar Casal* ca *„mal de la rosa"* în 1730, iar de către *Francesco Frapolli „pella-agra"* (piele aspră) în 1731, ulterior identificate cu avitaminoza PP.

În toate aceste cazuri şi în numeroase alte cazuri, se descriu simptomele bolilor fără să se menţioneze cauzele care le produc. Se poate menţiona că încă din antichitate s-a semnalat existenţa unei legături directe între consumul alimentelor şi vindecarea unor boli. Se ştia de mult că orbirea la întuneric se vindecă dacă pacientul mănâncă mult ficat. În secolul al XVIII-lea uleiul din ficat de cod era folosit pentru vindecarea rahitismului, frecvent întâlnit la marinarii britanici, iar mai târziu s-a descoperit că sucul de lămâie, vindecă scorbutul.

b. **Etapa cercetărilor experimentale** de descoperire a vitaminelor şi a descrierii simptomelor bolilor care apar în carenţa unor vitamine.

Descoperirea vitaminelor este strâns legată de progresele ştiinţifice realizate în domeniul chimiei şi a fiziologiei, în a doua jumătate a secolului al XIX-lea şi în prima jumătate a secolului XX.

Liebig, în perioada anilor 1840, menţionează existenţa unei corelaţii între consumul alimentelor şi apariţia unor boli. În lucrarea sa *„Scrisori despre chimie"*, formulează prima clasificare a substanţelor nutritive, punând bazele unei noi discipline, *chimiei fiziologice,* respectiv, *biochimiei.*

În concepţia lui *Liebig,* o dietă furajeră compusă în întregime din proteine, grăsimi, glucide şi săruri minerale, asigură în întregime necesităţile organismului animal.

Experienţele fiziologice ulterioare, efectuate în diferite laboratoare din mai multe ţări, au infirmat concepţia lui *Liebig* referitoare la alimentaţia animalelor. Astfel, *N. I. Lunin,* în 1881, a demonstrat experimental că şoarecii albi hrăniţi cu lapte de vacă au crescut normal, se reproduceau şi erau sănătoşi, iar cei hrăniţi numai cu substanţe care intrau în compoziţia laptelui (proteine, grăsimi, lactoză şi săruri minerale), se îmbolnăveau, nu se reproduceau şi după o anumită perioadă de timp (1—3 luni) mureau. *Lunin* ajunge la concluzia că în hrana naturală, asemenea laptelui, sunt prezente în cantităţi mici, pe lângă ingredinte nutritive de bază (proteine, grăsimi, glucide, săruri minerale şi apă) şi alte substanţe necunoscute, absolut necesare pentru viaţă (DUMITRU, 1970).

F. G. Hopkins, în 1912, efectuând experienţe similare cu cele ale lui *Lunin,* dar folosind în loc de şoareci, şobolani, ajunge la aceleaşi concluzii, arătând că în laptele proaspăt, alături de substanţele de bază, există unele principii alimentare, denumite de el, *„factori accesori"*, care nu pot fi sintetizaţi de organismul animal, fiind absolut necesari în alimentaţia animalelor. Tot *Hopkins* împreună cu *Osborne* şi *Mendel,*

Scanned with OKEN Scanner

prin alimentarea șobolanilor cu diferite tipuri de proteine, ajung la concluzia că proteinele de origine animală au o valoare nutritivă mai mare decât proteinele vegetale.

În 1913 *Osborne* și *Mendel*, înlocuind în dieta artificială grăsimea topită de porc cu untul de vacă, reușesc să restabilească creșterea normală a animalelor, demonstrând practic existența reală a unor principii alimentare active în unt.

În Japonia, între anii 1878 și 1883, numărul bolnavilor de beri-beri în rândul marinarilor era anual de 323 la 1.000 de oameni. Amiralul *Takaki*, comparând hrana marinarilor japonezi cu cea a marinarilor englezi care nu erau bolnavi, ajunge la concluzia că marinarii japonezi consumă prea puține proteine. El propune îmbogățirea rației alimentare a marinarilor cu proteine, introducerea legumelor și înlocuirea orezului decorticat cu orez nedecorticat.

Cercetări mai intense privind descoperirea vitaminelor au fost făcute de *C. Eijkman*, în perioada 1890—1898, când armatele din Indiile Olandeze s-au îmbolnăvit de beri-beri în proporție de peste 25% datorită unui consum îndelungat de orez decorticat. *Menson*, întemeietorul medicinii tropicale, afirma că boala beri-beri este provocată de un parazit care este transmis de la un om la altul prin intermediul unei insecte. Această afirmație nu a putut fi confirmată experimental.

C. Eijkman, în 1897, observă că găinile care consumă orez decorticat se îmbolnăvesc, prezentând simptome similare bolii beri-beri la om. El stabilește ulterior că boala păsărilor este o polinevrită. Tot el observă că păsările hrănite cu orez nedecorticat nu se îmbolnăvesc de polinevrită. Dacă în hrana păsărilor hrănite cu orez decorticat se adaugă tărâțe de orez nedecorticat, păsările se vindecă de polinevrită. Extractul apos din tărâțele de orez are proprietăți fiziologice similare cojilor de orez. Substanța activă care se găsește în pericarpul semințelor de orez (coji), aflată în mediu apos, nu precipită cu alcool și poate dializa prin membrane permeabile. *Eijkman* stabilește astfel cauza bolii beri-beri într-un factor nutritiv și nu unul microbiologic. La concluzii similare ajung ulterior și *Griyns*, compatriot cu *Eijkman*, care constată că prizonierii hrăniți cu orez decorticat se îmbolnăveau de beri-beri. Boala se datorește lipsei unei substanțe care nu se găsește în orezul decorticat ci numai în bobul de orez intact.

În 1911 *C. Funk* izolează din tărâțe de orez un preparat cristalin incolor și aciform cu punct de topire de 233°C, care administrat porumbeilor bolnavi de polinevrită, în doze de 0,02 g, determină o însănătoșire totală a acestora. Preparatul obținut de *Funk*, conținea 55,63% carbon, 5,29% hidrogen și 7,68% azot, fiind numit *vitamină*, adică amina vieții. Bolile cauzate de lipsa unor vitamine din alimente au fost denumite de *Funk, avitaminoze*. *Funk* menționează că în alimente se găsesc și alte vitamine, în lipsa cărora apar boli cum sunt scorbutul, rahitismul, pelagra etc. Pentru contribuția sa la descoperirea primei vitamine (vitamina B_1) și a unor avitaminoze, *C. Funk* este considerat pe merit, întemeietorul științei despre vitamine (vitaminologia) (DUMITRU, 1970).

c. **Etapa izolării, stabilirii structurii chimice, a proprietăților, a rolului vitaminelor** și a aplicării unor tratamente profilactice și curative cu vitamine, este etapa cea mai importantă, atât sub aspect științific, cât și în ce privește prevenirea și vindecarea bolilor carențiale.

Scanned with OKEN Scanner

În perioada primului și mai cu seamă a celui de-al doilea război mondial, sau în perioadele crizelor economice, când starea materială a multor pături sociale s-a înrăutățit, a crescut numărul bolnavilor de avitaminoze, crescând totodată în mod considerabil și interesul pentru descoperirea și obținerea unor noi vitamine.

În 1914, *McCollum* și *M. Davis,* au izolat un compus din fracțiuni lipidice, numit *factor de creștere A,* capabil să vindece xeroftalmia. În 1916 *J. Drummond,* atribuie numele acestui factor A de *vitamina A,* a cărei structură chimică este stabilită de *P. Karrer* din Elveția în 1931. În Danemarca, în timpul primului război mondial, când untul de vacă a fost înlocuit cu margarina, copiii se îmbolnăveau de xeroftalmie, cauzată de avitaminoza A.

În perioada 1927—1937, *A. Windaus,* descoperă structura provitaminelor D și mecanismul transformării acestora în vitamine D. În 1936, *H. M. Evans* și *D. E. Emerson* izolează din uleiul de grâu, α—, β— și γ—tocoferolii (vitamine E), cărora le stabilește structura moleculară, iar *P. Karrer* îi obține prin sinteză în 1938. În perioada 1929—1930, *G. O. Burr* și colab., descoperă simptomele avitaminozei F, datorită lipsei din alimentație a acizilor grași nesaturați (linoleic, linolenic, arahidonic) în insuficiența cărora apar tulburări cutanante, hepatice și de creștere.

În 1938, *H. Euler* și *P. Karrer,* au arătat că pigmenții carotenoidici sunt provitamine A și pot fi utilizați în tratamentele avitaminozei A. *H. Dam,* pe baza a numeroase observații efectuate în perioada 1929—1934 pune în evidență *vitamina K,* solubilă în grăsimi, denumită vitamina coagulării sau *vitamina K* (koagulation vitamina). Tot între cele două războaie mondiale s-a stabilit structura, denumirea și sinteza vitaminei B_2, numită și riboflavină de către *P. Karrer* și colab. (1933—1936). Din drojdia de bere s-a extras acidul folic, prezent și în frunzele de spanac, cu acțiune asupra anemiei macrocitare *(M. K. Mitchell* și colab., 1941). Din gălbenușul de ou, *F. Kögl* și *B. Tounis,* în 1936 au izolat *biotina* sau vitamina H. Piridoxina (vitamina B_6) s-a izolat din complexul vitaminelor B, iar structura acestei vitamine a fost stabilită de *R. Kuhn* și colab., în 1938. Pe cale de sinteză această vitamină a fost obținută de *S. Harris* și *K. Felkers* în 1939. *G. A. Elvehjem* și colab. izolează din ficat, în 1937, acidul nicotinic și amida acidului nicotinic (vitamina PP), folosită de *I. D. Sies* și colab. în 1938 în tratarea pelagrei la oameni (ENESCU și colab., 1990).

Datorită succeselor obținute în tratarea unor avitaminoze, în perioada interbelică numeroase state au manifestat un mai mare interes în ce privește studiul vitaminelor, intensificându-se cercetările referitoare la alimentația rațională a oamenilor și la furajarea animalelor.

În tabelul 1.5. se prezintă cronologia descoperirii și sintezei unor vitamine, iar în tabelul 1.6. se prezintă unele preparate vitaminice obținute de firma Hoffman la Roche din Basel — Elveția.

Determinarea vitaminelor se poate face prin metode chimice, fizico-chimice, microbiologice și biologice.

Scanned with OKEN Scanner

Tabelul 1.5

Cronologia descoperirii şi sintezei unor vitamine

Anul	Vitamine descoperite şi sintetizate
1914	Sinteza inozitolului
1916	Descoperirea vitaminei A, stabilirea structurii în 1933
1919	Se dă denumirea de vitamina C factorului antiscorbutic; sinteza vitaminei C în 1933
1926	Izolarea vitaminei B_2, sinteza în 1935
1927—1932	Izolarea şi stabilirea structurii vitaminei D_2
1934	Izolarea acidului pantotenic din ficat
1936	Sinteza vitaminei B_1
1938	Sinteza vitaminelor E
1939	Sinteza vitaminelor B_6 şi K
1940	Sinteza acidului pantotenic
1941	Izolarea acidului folic
1943	Sinteza biotinei
1946	Sinteza vitaminei A
1948	Izolarea în stare cristalină a vitaminei B_{12}
1951	Izolarea acidului lipoic, iar sinteza sa în 1954
1955	Stabilirea structurii moleculare a vitaminei B_{15}

1.5. NOMENCLATURĂ ŞI CLASIFICARE

Denumirea de vitamine (amine vitale) dată de *C. Funk* acestei grupe de substanţe se menţine şi în prezent, deşi unele vitamine nu conţin în molecula lor azot. Ea reflectă importanţa însemnată ce o au aceste principii alimentare pentru buna funcţionare a organismului uman, a plantelor şi animalelor. Nomenclatura vitaminelor se poate stabili după trei criterii:

— după nomenclatura veche (alfabetică)
— după rolul fiziologic şi terapeutic
— după structura chimică

După nomenclatura veche sau alfabetică, vitaminele continuă să se denumească şi în prezent cu ajutorul literelor mari din alfabetul latin (A, B, C, D, E, F, K etc.). În cadrul aceleiaşi clase, vitaminele noi descoperite prin utilizarea unor metode şi tehnici moderne de cercetare, se denumesc cu ajutorul indicilor. De exemplu vitaminele A_1, A_2, A_3; D_2—D_6; B_1—B_{15}; K_1—K_7 etc. La unele vitamine se formează subgrupe

Scanned with OKEN Scanner

Tabelul 1.6

Preparate vitaminice obținute de firma Hoffman La Roche, Basel, Elveția

Anul	Denumirea preparatului	Compoziția preparatului
1934	Redoxon	Vitamina C
1936	Benerva	Vitamina B_1
	Nestrovit	Preparat multivitaminic
1938	Ephynal	Vitamina E
1940	Synkavit	Preparat cu vitamina K
1942	Becozym	Vitamina B complex
1944	Benadon	Vitamina B_6
	Bepanthen	Acid pantotenic
	Calcium-D-Redoxon	Calciu, fosfor, vitamina C și D
	Protovit	Preparat multivitaminic
1948	Arovit	Vitamina A
1950	Berolase	Tiamin pirofosfat
	Litrison	Combinații de substanțe active pentru stimularea metabolismului ficatului
1953	Konakion	Vitamina K_1
1955	Rovigon	Vitaminele A și E
1959	Supradyn-Roche	Preparat multivitaminic
	Vitaminets	Preparat multivitaminic
1961	Benexol-Roche	Vitaminele B_1 și B_6
1964	Cal-C-Vita	Vitaminele C, D, B_6, calciu
1969	Berocca	Vitamina B complex și C
1978	Rocaltrol	Vitamina D

în cadrul aceluiași indice numeric, notate alfabetic cu litere mici, spre exemplu, vitaminele B_{12a}, B_{12b}, B_{12c}.

După rolul fiziologic și terapeutic ce-l îndeplinesc în organism vitaminele se denumesc astfel: vitamina antixeroftalmică (vitamina A), antihemoragică (vitamina K), antiberiberi (vitamina B_1), antirahitică (vitamina D), antisterilității (vitamina E), antiscorbutică (vitamina C), antipelagroasă (vitamina PP) etc.

După structura chimică vitaminele se denumesc: tiamină (vitamina B_1), riboflavină (vitamina D_2), piridoxină (vitamina B_6), acid ascorbic (vitamina C), acid paraaminobenzoic (vitamina H), tocoferol (vitamina E), acid pantotenic (vitamina B_3) etc.

Scanned with OKEN Scanner

Comisia de nomenclatură din cadrul Uniunii Internaționale de Biochimie (IUB) a stabilit reguli raționale pentru denumirea vitaminelor și a derivaților lor pe baza structurii chimice moleculare. Astfel, pentru vitaminele antixeroftalmice (vitaminele A) se recomandă denumirea de *retinol* (vitamina A_1), *retinal* (derivatul aldehidic), *acid retinoic* (derivatul carboxilic), *dehidroretinol* sau *retinol*$_2$ (vitamina A_2). Pentru vitaminele D se recomandă denumirile de *ergocalciferol* pentru vitamina D_2, întrucât provine din ergosterol, *cocalciferol* pentru vitamina D_3, care provine din 7-dehidrocolesterol, *22-dehidroergosterol* pentru vitamina D_4, *7-dehidrositosterol* pentru vitamina D_5, *7-dehidrostigmasterol* pentru vitamina D_6 etc.

Cu toate avantajele oferite de nomenclatura chimică în practica medicală și farmaceutică se folosește denumirea alfabetică și alte denumiri pe care le vom relata la prezentarea vitaminelor.

Clasificarea vitaminelor se poate realiza de asemenea după mai multe criterii (structură chimică, rol fiziologic, solubilitate, spectre de absorbție, grupări funcționale etc.). Dintre toate aceste criterii, cel mai cuprinzător și mai practic s-a dovedit a fi criteriul solubilității. După solubilitatea vitaminelor în solvenți organici și în apă, acestea se clasifică în două grupe mari: *vitamine liposolubile* și *vitamine hidrosolubile*.

Din grupa vitaminelor liposolubile, care se dizolvă în solvenți organici și nu se dizolvă în apă, fac parte vitaminele A, D, E, K, F, iar din grupa vitaminelor hidrosolubile, care se dizolvă în apă și nu se dizolvă în solvenți organici, fac parte complexul de vitamine B (vitaminele B_1, B_2, B_6, B_{12}, PP, acidul pantotenic, biotina, acidul paraaminobenzolic, acizii folici și folinici, mezoinozitolul etc.), vitaminele C, vitaminele P etc.

În trecut, s-au considerat ca vitamine și acizii lipoici, colina, vitamina B_{15} (acidul panganic), vitamina H_3 (procaina) etc., care deși manifestă importanță biologică și terapeutică, nu îndeplinesc toate condițiile pentru a fi denumite vitamine.

Vitaminele liposolubile sunt compuși izoprenici, având molecule nepolare, hidrofobe. Nu s-a identificat până în prezent rolul de coenzime al acestor vitamine. Absorbția, transportul și metabolismul lor este corelat cu cel al grăsimilor. Tulburările biliare și steatorea determină adesea o absorbție defectuoasă a vitaminelor liposolubile, care în sânge sunt transportate sub formă de lipoproteine. Din sânge, prin intermediul bilei ajung din nou în intestin, de unde sunt eliminate prin fecale. Vitaminele A, D și K sunt depozitate predominant în ficat, iar vitaminele E și F în țesutul adipos.

Prin noțiunea de *provitamine*, se înțeleg compuși inactivi (exogeni), care se transformă în organismul uman și animal în vitamine. Astfel, carotenoidele provitaminice se transformă în intestin și ficat, sub acțiunea carotenazei în vitamine A. Sterolii (ergosterolul, colesterolul, sitosterolul, stigmasterolul etc.) se transformă prin iradiere și dehidrogenare în vitamine D. Transformarea provitaminelor în vitamine depinde și de felul speciilor, întrucât nu toate animalele au echipamentul enzimatic necesar acestor transformări.

Majoritatea covârșitoare a vitaminelor hidrosolubile îndeplinesc rolul de coenzime. Ele iau parte în metabolismul proteinelor, procesele

Scanned with OKEN Scanner

bioenergetice, sunt necesare funcționării normale a sistemului nervos. Vitaminele din complexul B, sunt într-o strânsă interrelație funcțională și se găsesc împreună în drojdia de bere, ficat, boabele cerealelor, legume etc. Ele se mențin în circulația sanguină numai în concentrația necesară funcțiilor metabolice pe care le realizează. Partea excedentară se elimină prin urină, cu excepția vitaminei B_{12}, care se depozitează în ficat.

Clasificarea vitaminelor în liposolubile și hidrosolubile, realizată în 1915 de către *Osborne* și *Mendel*, se păstrează și în prezent, cu toate că unele vitamine și derivații acestora sunt insolubile în solvenți nepolari și polari, iar pe de altă parte unele preparate vitaminice sunt solubile în apă, deși vitaminele naturale sunt liposolubile. Astfel, vitaminele K naturale sunt liposolubile, iar cele obținute prin sinteză sunt hidrosolubile. Unele vitamine hidrosolubile se pot obține în forme liposolubile și invers. Cu toate aceste abateri de la regulă, în toate țările se păstrează clasificarea vitaminelor în liposolubile și respectiv hidrosolubile, fiind utilă și ușoară pentru practica medico-farmaceutică.

Scanned with OKEN Scanner

A. VITAMINE LIPOSOLUBILE

Capitolul 2. VITAMINE A

2.1. Scurt istoric 25
2.2. Structura moleculară, izomeri, obținere și activitate vitaminică 27
2.2.1. Stereoizomeri 29
2.2.2. Metode de obținere 30
2.2.3. Activitate vitaminică 31
2.3. Proprietăți 32
2.4. Metode de dozare și identificare 33
2.4.1. Dozarea vitaminei A_1 din sânge 34
2.4.2. Dozarea vitaminei A_1 din țesut hepatic 34
2.4.3. Dozarea vitaminei A_1 din lapte și smântână 34
2.4.4. Dozarea vitaminei A_1 din medicamente 35
2.5. Răspândire, absorbție și necesități zilnice 36
2.6. Provitamine A 40
2.6.1. Felul și potențialitatea vitaminică a carotenoidelor 40
2.6.2. Absorbția și transformarea carotenoidelor în vitamine A 45
2.7. Rol și funcții 50
2.7.1. Rolul carotenoidelor A în procesul vederii 50
2.7.2. Rolul vitaminelor A în protejarea și refacerea epiteliilor 55
2.7.3. Rolul vitaminelor A în procesele de creștere și reproducere 56
2.7.4. Hipovitaminoze și hipervitaminoze 57
2.7.5. Corelația activității vitaminelor A cu a altor compuși 58
2.76. Vitaminele A și malignitatea 59
2.7.7. Antivitamine A 62

Vitaminele A s-au denumit în trecut *vitamine antixeroftalmice, antiinfecțioase, vitamine de creștere liposolubile, vitamine de apărare a epiteliilor, axeroftoli* etc.

Comisia pentru nomenclatură a Uniunii Internaționale de Biochimie (IUB), împreună cu comisia similară a Uniunii Internaționale de Chimie Pură și Aplicată (IUPAC) au stabilit în 1966 regulile pentru denumirea vitaminelor și a derivaților acestora. În conformitate cu nomenclatura internațională actuală, vitamina A_1 se numește *retinol*, iar vitamina A_2 se numește *3, 4-dehidroretinol*. Aldehida care provine de la vitamina A_1 se numește *retinal* (retinen în trecut), iar compusul

carboxilic care se formează din aceeași vitamină se numește *acid retinoic*. Dintre vitaminele A, cele mai active și cele mai mult utilizate în numeroase tratamente profilactice și curative sunt: retinolul, retinalul și acidul retinoic.

2.1. SCURT ISTORIC

Produsele alimentare bogate în vitamina A_1 sunt cunoscute din antichitate, fiind menționate în papirusul „Ebber" de peste 3520 de ani. Încă din acele timpuri foarte îndepărtate se știa că hrana bogată în ficat de pește favorizează vederea oamenilor în timpul nopții, iar consumul îndelungat de hrană uscată, lipsită de fructe și legume proaspete, determină diminuarea intensă a vederii (hemeralopia). Numeroase observații și experiențe privind creșterea și dezvoltarea normală a oamenilor prin consum de alimente cu conținut bogat în vitamine, precum și dereglările metabolice care apar în lipsa sau insuficiența unor vitamine A din hrană se prezintă succint în capitolul introductiv.

Boala „Kikan", descrisă în 1857 la copii din Extremul Orient, caracterizată prin umflarea pleoapelor, opacifierea corneei, umplerea ochilor cu lichid purulent și în final apariția orbirii, s-a stabilit că se datorează unor cauze alimentare.

La sfârșitul secolului al XIX-lea se efectuează numeroase experiențe sistematice cu animale de laborator hrănite cu alimente purificate (hrană sintetică), formată din cazeină pură, glucide, săruri minerale și apă. S-a remarcat că după 70—120 de zile de la utilizarea acestor alimente are loc o stagnare a creșterii în greutate a animalelor, apar inflamații la nivelul ochilor, a aparatului respirator, a glandelor submaxilare etc. Asemenea dereglări s-au remarcat ulterior și la iepuri, păsări, câini, oi, vaci, cai, maimuțe și chiar la oamenii hrăniți cu alimente degresate. Prin adăugarea unor produse naturale (unt, ulei, ficat de pește, grăsimea din gălbenușul de ou) în hrana sintetică cu care erau furajate animalele, s-au îndepărtat simptomele patologice și s-a restabilit creșterea normală a animalelor.

Dacă la dieta sintetică dată animalelor se adaugă ulei extras din boabe de porumb, din semințe de soia, floarea-soarelui, in și bumbac, în proporție de 10—20% din greutatea dietei, simptomele patologice nu pot fi preîntâmpinate, deoarece lipsește din hrană factorul de creștere liposolubil (DUMITRU, 1970).

În 1904 s-au semnalat la un număr mare de copii hrăniți cu lapte degresat necroze grave ale corneei, iar boala a fost numită „foametea grasă". Observații oarecum similare au făcut în 1909, I. STEPP și F. HOPKINS, care au remarcat că încetează creșterea și apar simptome patologice la animalele hrănite cu furaje din care s-au făcut extracte cu amestec de alcool și eter. Prin experimentări cu șobolani tineri, hrăniți numai cu proteine, glucide, slănină și sare, aceștia nu ajung la maturitate și apar simptome patologice. Dacă acestor șobolani li se adaugă în hrană extract eteric din unt sau din gălbenuș de ou, creșterea animalelor revine la normal, fapt ce i-a determinat pe autorii experimentelor să afirme că în hrana naturală se găsesc unii factori esențiali de creștere (ENESCU și colab., 1990).

Scanned with OKEN Scanner

Experienţe similare efectuate în mod deosebit în perioada 1910—1920, au stabilit că apariţia xeroftalmiei la om se datoreşte lipsei din hrană a factorului de creştere, care este solubil în grăsimi, numit în 1914 „factor de creştere liposolubil A", de către MC COLLUM şi M. DAVIES. În 1916, acest factor stabil în mediu alcalin, a fost denumit de DORTMUND, *vitamina A*. În această perioadă s-a stabilit că produsele alimentare de origine animală sunt, în general, mai bogate în vitamină A decât cele vegetale. Ficatul unor peşti marini şi de apă dulce, laptele, gălbenuşul ouălor etc., au un conţinut mai ridicat în vitamina A decât fructele, legumele şi seminţele unor plante superioare. S-a remarcat de asemenea existenţa unor deosebiri în ce priveşte conţinutul vitaminei A_1 în diferitele soiuri şi varietăţi de porumb, morcovi, soia, roşii, lucernă etc.

În timpul primului război mondial, copiii din Danemarca au suferit afecţiuni oculare grave, într-o proporţie însemnată, din cauza alimentării acestora cu lapte smântânit şi cu margarină, datorită exportării untului, care este bogat în vitamina A.

În 1920, H. STEENBOCK şi P. W. BOUTWEL au formulat ipoteza că pigmentul portocaliu extras din plante — carotenul — posedă o activitate biologică similară cu a vitaminei A, preîntâmpinând îmbolnăvirea oamenilor şi a animalelor de afecţiuni oculare. Ulterior s-a stabilit că doze zilnice de 0,01 mg caroten, obţinut din morcovi portocalii, dizolvat apoi în ulei vegetal (inactiv sub aspect vitaminic), sunt suficiente pentru îndepărtarea simptomelor patologice oculare.

În 1931 P. KARRER şi colab., au reuşit să izoleze vitamina A_1 din produse naturale şi să-i stabilească structura chimică, iar mai târziu, în 1937, au reuşit să o obţină pe cale sintetică în laborator.

O contribuţie însemnată privind cunoaşterea surselor de vitamina A_1 pentru om şi animale a adus-o T. MOOR în 1930, care analizând ţesutul hepatic al animalelor de experienţă, a demonstrat că preparatele de caroten extrase din plante, administrate şobolanilor avitaminizaţi sunt transformate de organismul animal în vitamina A_1. Rezultatele experienţelor lui T. MOOR au fost repetate ulterior şi cu alte animale, fiind confirmate de numeroşi cercetători, fapt ce i-a determinat pe H. EULER şi P. KARRER să concluzioneze în 1938, pe baza unui bogat material experimental, că pigmenţii carotenoidici extraşi din plante au aceleaşi proprietăţi ca şi vitamina A_1, numindu-i *provitamine A*. Ei au proprietatea de a preîntâmpina îmbolnăvirea oamenilor şi a animalelor şi de a înlătura simptomele avitaminozei A. După aceşti autori, transformarea carotenoidelor în vitamine A s-ar realiza în ficat, sub acţiunea carotenazei. Cercetările ulterioare au arătat că acest proces se realizează preponderent în intestinul subţire şi foarte puţin în ficat, dar nu toate carotenoidele se pot transforma în vitamina A, ci numai acele care au în moleculă un inel β-ononic nesubstituit.

Omul şi animalele nu pot sintetiza „de novo" vitaminele A, dar şi le pot procura din alimente în cantităţi suficiente prin transformarea carotenoidelor provitaminice în vitamine A. Moleculele carotenoidelor netransformate în vitamine A nu au activitate vitaminică în organism.

Numele de vitamină A trebuie considerat generic, valabil pentru vitamina A_1, vitamina A_2, neovitamina A_1 şi pentru unele vitamere (retinal, acid retinoic) şi diferiţi izomeri ai vitaminelor A.

Scanned with OKEN Scanner

2.2. STRUCTURĂ MOLECULARĂ, IZOMERI, OBȚINERE ȘI ACTIVITATE VITAMINICĂ

Structura moleculară a vitaminelor A și a derivaților acestora se prezintă în figura 2.1.

Dintre vitaminele A și derivații acestora, cea mai importantă și mai larg răspândită este *vitamina* A_1, care se mai numește *retinol, vitamină antixeroftalmică* (axeroftol), *vitamina creșterii, vitamină antiinfecțioasă, vitamina de apărare a epiteliilor, factor de creștere liposolubil* etc.

Din punct de vedere chimic, vitamina A_1 este un alcool ce are în moleculă un inel β-iononic hidrocarburic, o catenă laterală formată din nouă atomi de carbon, conține cinci duble legături conjugate și cinci

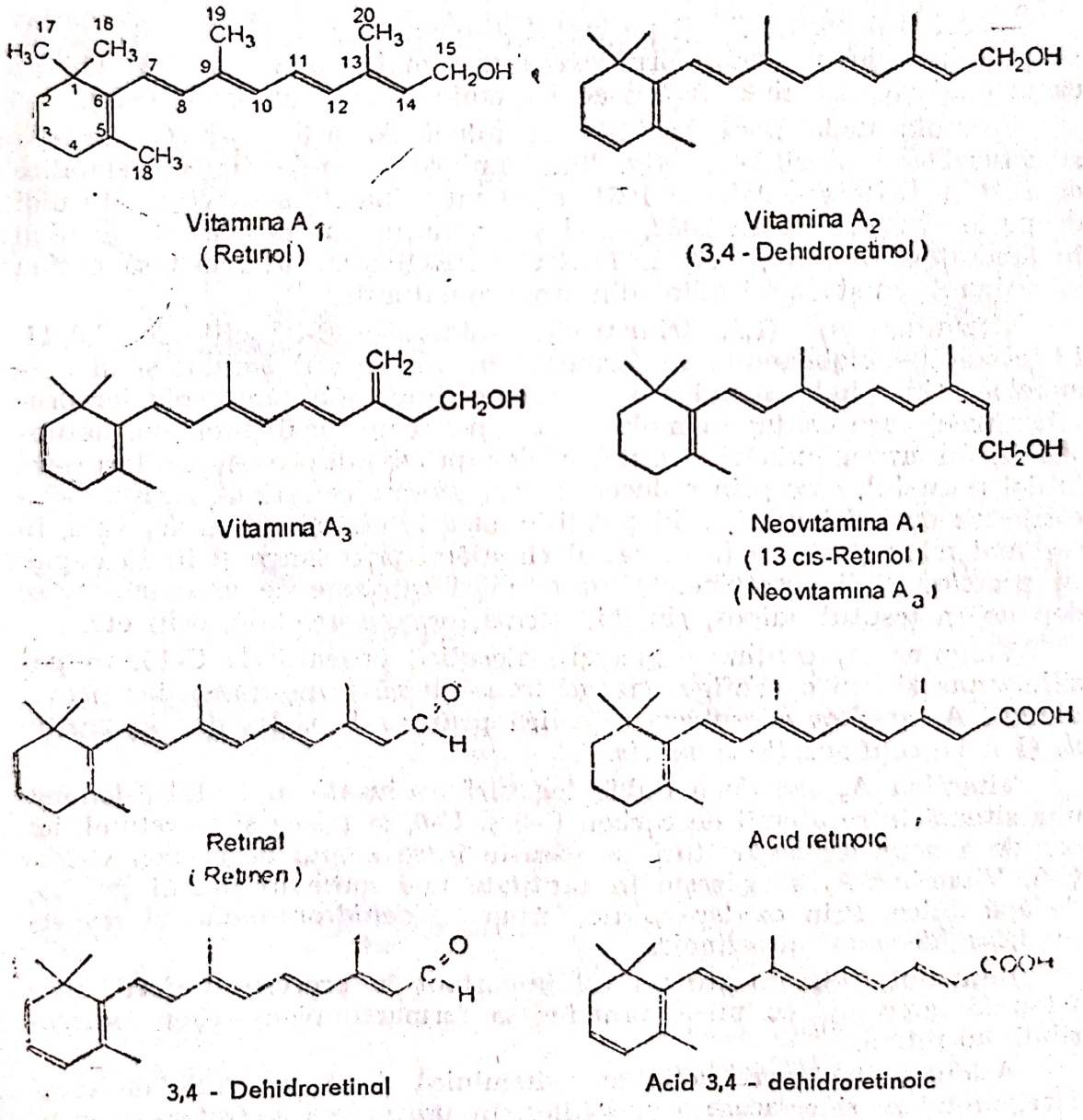


Fig. 2.1. Structura moleculară a vitaminelor A și a derivaților acestora

Scanned with OKEN Scanner

radicali metili. Părțile structurale caracteristice s-au pus în evidență prin următoarele reacții:

— nucleul β-iononic s-a pus în evidență prin formarea unei molecule de acid geronic, prin oxidarea vitaminei A_1 cu ozon;

— gruparea alcoolică primară s-a identificat atât prin reacția de esterificare, cât și prin formarea retinalului, printr-o oxidare blândă și respectiv a acidului retinoic, prin oxidare energică;

— conține cinci duble legături (una în ciclul β-iononic și patru în catena laterală), care prin hidrogenare catalitică se hidrogenează, iar vitamina A_1 se transformă în perhidrovitamină cu formula moleculară brută $C_{20}H_{40}O$, care nu are activitate vitaminică;

— cele două grupări metil din catena laterală se pun în evidență prin formarea a două molecule de acid acetic, în urma degradării catenei laterale prin oxidare cu permanganat de potasiu în mediu bazic;

— cei trei metili fixați pe inelul β-iononic de la C-16, C-17, C-18, se pun în evidență prin formarea a trei molecule de acid acetic, în urma oxidării vitaminei A_1 cu acid cromic la cald (OERIU, 1974).

Formula moleculară brută a vitaminei A_1 este $C_{20}H_{30}O$, iar cea structurală se prezintă în fig. 2.1.. Ambele formule au fost stabilite de P. KARRER și colab. în 1931, când vitamina A_1 s-a extras din ulei de pește și respectiv în 1937, când s-a realizat sinteza acestei vitamine în laborator. În 1940, G. BAXTER și D. ROBSON au reușit să obțină vitamina A_1 în stare cristalină din produse naturale.

Vitamina A_1 (1,1,5-trimetil-6-(15-hidroxi-9,13-dimetil-nona-7,9, 11, 13-tetraenil)-ciclohexen-5) se formează în organismul omului și al animalelor prin scindarea oxidativă a catenei interne a carotenoidelor provitaminice, care conțin în moleculă cel puțin un ciclu β-iononic nesubstituit. În urma oxidării carotenoidelor provitaminice A, se formează inițial retinalul, care prin reducere se transformă în retinol. Acesta se va esterifica cu acizi grași, acid palmitic, stearic etc. și se va depozita, în cea mai mare parte în ficat, restul circulând prin sânge și limfă cuplat cu proteine și lipoproteine. O foarte mică cantitate de vitamina A_1 se depune în țesutul adipos, rinichi, dermă, organe genitale, ochi etc.

Vitamina A_1 conține o grupare alcoolică primară, la C-15, în poziție *trans* și are o configurație *all-trans* (adică trans-trans), iar neovitamina A_1 are tot o grupare alcoolică primară la C-15, dar în poziție *cis* și are o configurație *trans-cis*.

Vitamina A_2 are două duble legături conjugate în inelul β-iononic una situată între atomii de carbon C-5 și C-6, la fel ca și la retinol, iar cea de a doua dublă legătură se găsește între atomii de carbon C-4 și C-5. Vitamina A_2 se găsește în cantitate mai mare în ficatul peștilor de apă dulce. Prin oxidare poate forma *3,4-dehidroretinalul* și respectiv *3,4-dehidro-acidul retinoic*.

Retinalul (retinen) are un rol important în procesul vederii, contribuind împreună cu unele proteine la formarea pigmenților fotosensibili din retină.

Acidul retinoic are activitate vitaminică A în procesele de creștere, protejare și refacere a epiteliilor, în prevenirea și tratarea cancerului epitelial, dar nu are rol în procesul vederii și în reproducere.

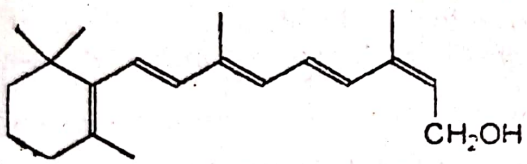
Scanned with OKEN Scanner

2.2.1. STEREOIZOMERI

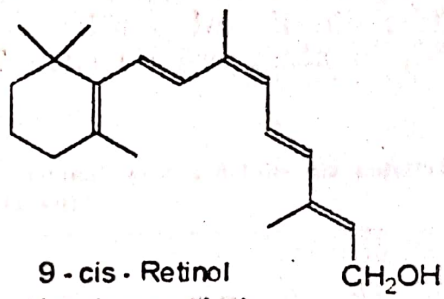
Întrucât molecula vitaminei A_1 conține 5 duble legături conjugate și 5 metili, teoretic este posibil să existe 32 forme stereoizomerice (stereoizomeri). Din cei 32 de stereoizomeri posibili ai retinolului se cunosc până în prezent 6, care s-au obținut din alcoolii corespunzători, prin oxidare. Structura moleculară a unor stereoizomeri naturali și obținuți prin sinteză se prezintă în figura 2.2.

Dintre stereoizomerii menționați în figura 2.2., *neovitamina A* este un izomer natural, iar restul s-au obținut prin sinteză. Când toate dublele legături ale stereoizomerilor sunt în poziție *trans*, se folosește denumirea de *trans-total* sau de *all-trans*, iar când dubla legătură terminală se găsește în poziție *cis*, se utilizează prefixul *neo*.

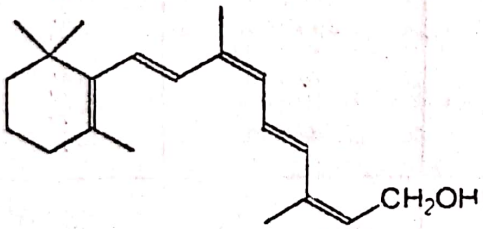
Toți izomerii *trans-total* au o activitate vitaminică ridicată. Activitatea vitaminică a retinolului chimic pur este folosită pe plan internațional ca standard, fiind apreciată cu 100%. Restul izomerilor au o activitate vitaminică mai slabă decât a retinolului.



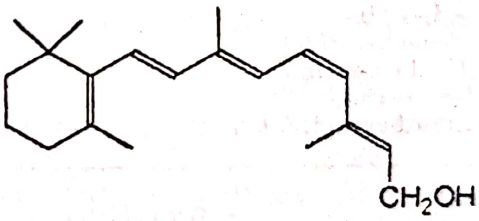
13 - cis - Retinol
(Neovitamina Aa)



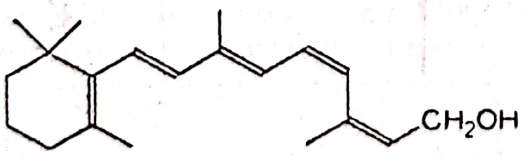
9 - cis - Retinol
(Izovitamina Aa)



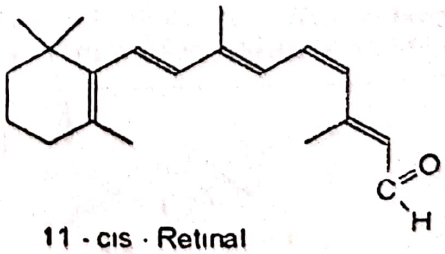
9,13 - dicis - Retinol
(Izovitamina Ab)



11 - cis - Retinol
(Neovitamina Ab)



11,13 - dicis - Retinol
(Neovitamina Ac)



11 - cis - Retinal
(Neo retinal b)

Fig. 2.2. Structura moleculară a unor stereoizomeri naturali și obținuți prin sinteză ai vitaminei A_1

Scanned with OKEN Scanner

Activitatea vitaminică a unor izomeri ai retinolului se prezintă în tabelul 2.1.

Unii cercetători apreciază biopotența *13-cis-retinolului* la șobolani de 66%, iar la puii de găină de 50%. Aceste aprecieri s-au făcut prin determinarea conținutului acestor izomeri din ficat.

11-cis-retinalul (Neoretinal b) se găsește în cantitate relativ mare în ochii crustaceelor. În retina unor organisme animale s-au pus în evidență *5,6-epoxi-retinolul* (figura 2.3.), care se formează probabil prin oxidarea vitaminei A_1.

Izomerii *cis* au o răspândire mai slabă în natură decât izomerii *trans*. Vitamina A_2, retinalul și acidul retinoic pot forma stereoizomeri similari retinolului, întrucât dispun de același sistem polienic și grupări metilice.

2.2.2. METODE DE OBȚINERE

Vitamina A_1 se poate obține prin mai multe căi și metode, atât din produșii naturali, cât și prin sinteză.

În anii 1945—1950 retinolul se obținea prin saponificarea uleiului extras din ficatul peștilor marini cu o soluție alcoolică de NaOH, la 75°C, în atmosferă de azot. Tot în această perioadă, vitamina A_1 s-a

Tabelul 2.1

Activitatea vitaminică a unor izomeri ai retinolului sub formă de acetați și a unor compuși retinoici, exprimată în UI/g

Izomeri	Activitate vitaminică (UI/g)	Biopotență (%)
All-trans-retinol	2 904 000	100%
13-cis-retinol	2 190 000	75%
9-cis-o-cis-retinol	607 000	21%
9,13-di-cis-retinol	680 000	24%
11-cis-retinol	690 000	24%
11,13-di-cis-retinol	428 000	15%
Compuși retinoici	**Activitate vitaminică (UI/g)**	**Biopotență (%)**
Retinol (vitamina A_1)	3 330 000	115%
Acetat de retinol-trans total	2 904 000	100%
Acid retinoic (metil ester)	—	100%
5,6-epoxi-retinol	—	108%
5,8-epoxi-retinal	—	60%
Acid metil-5,8-epoxi-retinoic	—	80%

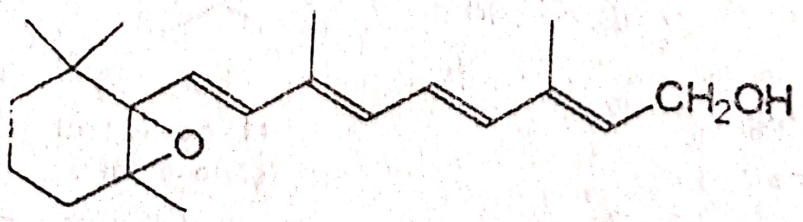


Fig. 2.3. Structura 5,6-epoxi-retinolului

Scanned with OKEN Scanner

obținut prin ruperea oxidativă a catenei interne a β-carotenului cu H_2O_2/OsO_4 și reducerea retinalului format în prima fază. O altă metodă utilizată a constat din condensarea β-ionon-C-13-cetonă cu esterul metilic al acidului γ-bromcrotonic. *O Isler*, transformă citratul extras din uleiul fructelor citrice în β-iononă, din care prin reacția Grignard, formează retinol, care prin esterificare cu acidul palmitic se obține palmitatul de retinol, o soluție de culoare galbenă, care se înglobează în granule sferice de gelatină solidă. Prin utilizarea unor agenți de solubilizare (polisorbat 80) se pot obține soluții apoase de retinol-palmitat, la care se adaugă antioxidanți (acid ascorbic 0,1%, α-tocoferol 3% EDTA-Na_2 0,2% etc.), pentru a se înlătura inactivarea retinolului (ENESCU, 1990).

Tot pe cale de sinteză s-a obținut și *13-cis-retinolul, retinalul* și *acidul retinoic*, a cărui activitate vitaminică reprezintă aproximativ 60% din cea a acetatului de retinol.

Dacă se încălzește retinolul cu HCl, în alcool anhidru, se obține anhidroretinolul, izolat ulterior și din produse naturale. Activitatea vitaminică a acestui compus, lipsit de gruparea OH, nu se cunoaște încă, iar structura moleculară se prezintă în figura 2.4. Sub aspect structural, anhidroretinolul îndeplinește condițiile de a fi o antivitamină A.

În ultimul timp, vitaminele A se extrag în cantitate mare din uleiul de pește și din ficatul ursilor polari, prin metode de distilare în vid, cristalizare fracționată și separare cromatografică.

2.2.3. ACTIVITATE VITAMINICĂ

Activitatea biologică a retinolului se exprimă pe plan internațional prin Unități Internaționale (UI). O unitate internațională (UI) este echivalentă cu activitatea vitaminică a 0,3 μg de retinol pur, sau cu 0,344 μg de acetat de retinol pur sau cu 0,55 μg de transretinol-palmitat, sau cu 0,6 μg de β-caroten dizolvat în ulei de cocos și stabilizat cu hidrochinonă.

Un gram de retinol conține $3{,}33 \cdot 10^5$UI. Dacă se exprimă activitatea vitaminică a retinolului în unități gama, trebuie să înmulțim numărul de UI cu 0,3. Raportul între 1 UI de retinol și 1 UI de β-caroten este de 1 la 2. Un gram de β-caroten cristalizat conține 1 670 000 UI de retinol. O unitate internațională este echivalentă cu 0,359 μg de propionat de retinol, iar 1 μg de β-caroten este echivalent cu 0,16 μg retinol (ENESCU, 1990). Unitatea CLO (Cod Liver Oil — ulei de pește) corespunde la 125 μg de β-caroten pur.

Transformarea carotenoidelor provitaminice A în retinol foarte rar se obține în proporție de 100% și acest procent se realizează numai din β-caroten. În scopuri practice, activitatea vitaminică potențială a ali-

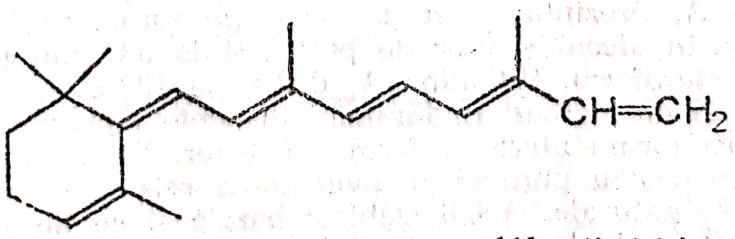


Fig. 2 4. Structura moleculară a anhidroretinolului

Scanned with OKEN Scanner

mentelor se exprimă în retinol echivalenți (RE). Un retinol echivalent are aceiași activitate vitaminică cu cea a unui μg de retinol, sau a 6 μg de β-caroten, sau cu a 12 μg de alte carotenoide (1 RE = 1 μg retinol = 6 μg β-caroten = 12 μg alte carotenoide) (DEVLIN, 1986).

2.3. PROPRIETĂȚI

În stare pură, vitamina A_1 se obține sub formă de cristale lamelare de culoare galbenă, iar vitamina A_2 sub formă de ulei galben. Ambele vitamine sunt insolubile în apă, solubile însă în grăsimi, uleiuri, solvenți organici (cloroform, acetonă, benzen, ciclohexan). În alcooli (etilic, metilic) se dizolvă în proporții diferite.

Atât vitamina A_1 cât și vitamina A_2 sunt substanțe autooxidabile, termostabile în lipsa aerului, foarte sensibile la acțiunea oxidanților și a luminii, în special a radiațiilor ultraviolete.

Vitaminele A sunt foarte ușor degradate sub acțiunea luminii, oxigenului și căldurii, datorită dublelor legături conjugate ce le conțin. Prin barbotarea aerului cald la 120°C în ulei cu vitamina A, acestea se degradează complet în maximum 4 ore. Dacă același ulei cu vitamine este încălzit în lipsa aerului, vitaminele rezistă până la 130°C. Vitaminele A sunt degradate ușor și de substanțele oxidante cum sunt peroxizii, ozonul, uleiuri și grăsimi râncede, clorura ferică etc. Sub acțiunea luminii solare, a radiațiilor X și UV, vitaminele A se degradează până la β-iononă, care se recunoaște prin mirosul de viorele. Datorită efectelor negative ale luminii asupra vitaminelor A se recomandă conservarea și păstrarea acestor vitamine în sticle brune și în camere întunecoase. Pentru a evita inactivarea și degradarea vitaminelor A în soluție sau în preparate farmaceutice se adaugă antioxidanți (tocoferoli, lecitină, hidrochinonă, chinhidronă etc.). În scopuri industriale se recurge la filtrarea soluțiilor vitaminice prin grăunțe de ovăz decorticat care conțin substanțe antioxidante capabile să protejeze vitaminele A (BEDELEANU, 1985).

Pentru o păstrare mai îndelungată a vitaminelor este recomandabil ca acestea să se dizolve în grăsimi sau uleiuri întrucât în soluțiile acestora se pot adăuga antioxidanți care protejează vitaminele de degradări oxidative.

Vitamina A_1 se topește la 62—64°C. Ea cristalizează din metanol sub formă de plăci galbene, cu punctul de topire la 8°C. Plăcile includ în exteriorul lor metanol, iar la temperatura camerei se prezintă sub formă de ulei galben vâscos, optic activ. Din formiatul de etil, propilen sau prin distilare se obține retinolul mai pur, cu punct de topire cuprins între 63—65°C. Neoretinolul pur se topește la 58—60°C.

Vitamina A_1 prezintă benzi de absorbție caracteristice la 325 nm pentru soluția în alcool și eter de petrol și la 331 nm pentru soluția în benzen și cloroform. Vitamina A_1 distilă la 137°C, la o presiune de 10^{-3}mm coloană de mercur. În lumină ultravioletă prezintă fluorescență diferită pentru forma liberă și forma de ester. Fenomenul de fluorescență servește pentru punerea în evidență a retinolului în diferite țesuturi și surse naturale. Acizii slabi și bazele slabe nu modifică semnificativ activitatea biologică a retinolului.

Scanned with OKEN Scanner

Vitaminele A, întrucât conțin grupări hidroxilice la atomii de carbon primari, dau cu ușurință reacții de esterificare. Esterii sunt în general mult mai stabili decât vitaminele neesterificate.

Sub aspect chimic, vitaminele A și derivații acestora sunt substanțe biologic active. Având în moleculă un sistem polienic conjugat, ele reacționează cu ușurință cu hidrogenul, oxigenul, halogenii etc., formând diferiți compuși carotenoidici care nu au activitate vitaminică. Nu s-au semnalat reacții de polimerizare ale vitaminelor A în celule și țesuturi. În organismele vegetale și animale se găsesc atât în stare liberă sub formă de cristale sau dizolvate în grăsimi, cât mai cu seamă sub formă de complecși carotenolipidici, carotenolipoproteici, carotenoproteici, carotenometaloproteici, esteri etc. Vitaminele A în soluție cloroformică dau cu $SbCl_3$ colorații albastre, cu spectre de absorbție caracteristice. Soluția vitaminei A_2 are spectru maxim de absorbție la 620 nm, iar a vitaminei A_2 la 693 nm. Aceste reacții se folosesc la identificarea și dozarea colorimetrică a vitaminelor A (reacția Carr-Price).

Vitamina A_2, extrasă din ficatul peștilor de apă dulce, se prezintă sub formă de ulei galben-portocaliu, cu spectru de absorbție la lungimea de undă 351 nm. Vitamina A_2 este mai sensibilă la oxidare decât retinolul. Prin tratarea acesteia cu HCl în etanol anhidru se obține anhidrovitamina A_2.

Retinalul s-a extras din pielea unor broaște *Rana aesculenta, Rana pipiens* și din retină.

Acetatul de retinol se prezintă sub formă uleioasă (sau amestec de ulei și cristale), de culoare galben-portocalie, sensibil la lumină, cu miros și gust caracteristic. Este insolubil în apă, fiind ușor solubil în etanol, uleiuri vegetale, cloroform, oleat de etil. Soluțiile uleioase sunt stabile la căldură în lipsa peroxizilor. Stabilitatea acestui produs farmaceutic crește în ulei de parafină, ulei de arahide sau în oleat de etil, prin adăugarea a 0,05% galat de propil, hidrochinonă, α-tocoferol. Stabilitatea comprimatelor cu vitamina A scade prin creșterea umidității.

Palmitatul de retinol prezintă proprietăți similare acetatului de retinol. Din palmitatul de retinol se pot obține soluții apoase cu ajutorul agenților de solubilizare (polisorbat 80, cromofor R etc.), care nu suportă încălzirea pentru sterilizare și necesită adăugarea unor antioxidanți (α-tocoferol 3%, acid ascorbic 0,1%, $EDTA\text{-}Na_2$ 0,2%).

Dispersia de retinol-palmitat conține un amestec de glicerol sau polienglicol și un compus tensioactiv de tipul polisorbaților pentru dizolvarea vitaminei. La diluarea acestui amestec cu apă se formează soluții limpezi, ușor resorbabile pe cale orală (BEDELEANU, 1985).

Acetatul și palmitatul de retinol sunt forme farmaceutice mai stabile, frecvent utilizate la obținerea preparatelor farmaceutice ce conțin retinol.

2.4. METODE DE DOZARE ȘI IDENTIFICARE

Metodele fizice și fizic -chimice se bazează pe dozarea vitaminelor pe baza spectrului lor de absorbție în ultraviolet, la lungimea de undă de 328 nm pentru vitamina A_1 și la 352 nm pentru vitamina A_2.

Scanned with OKEN Scanner

În prezent, se folosesc mai frecvent metodele care se bazează pe reacția CARR-PRICE. Dozarea vitaminelor se realizează în lumină monocromatică, pentru vitamina A_1 la 620 nm, iar pentru vitamina A_2 la 693 nm. Culoarea albastră care se formează prin reacția vitaminelor A cu $SbCl_3$ este puțin stabilă, de aceea citirea spectrelor de absorbție trebuie să se facă cât mai repede. Vitaminele A dau cu diclorhidrina glicerolului o culare roșie mai stabilă, cu maxim de absorbție pentru retinol la 550 nm.

La folosirea metodelor fluorimetrice se are în vedere că fluorescența vitaminei A_1 este verde, iar a vitaminei A_2 este roșie. Vitaminele A dau cu H_2SO_4 concentrat o culoare albastră, similară cu cea obținută cu $SbCl_3$. Cu acidul tricloracetic dau o culoare galben-albastră, iar cu $AsCl_3$ dau o culoare roșie, care virează rapid spre albastru. Dozarea vitaminelor A prin metode spectrofotometrice se face ținând seama de volumul soluției în ml, extincția citită la 328 nm pentru retinol și cantitatea de substanță luată în lucru, exprimată în grame sau ml și de extincția specifică $E^{1\%}_{1\,cm}$ conform formulelor de calcul:

$$mg = \frac{V \cdot E \cdot 1\,000}{E^{1\%}_{1\,cm} \cdot 100 \cdot G}; \quad \mu g = \frac{V \cdot E \cdot 10^6}{E^{1\%}_{1\,cm} \cdot 100 \cdot G}$$

Dacă soluțiile vitaminice sunt prea concentrate, ele se vor dilua și se va calcula volumul soluției diluate. Aceleași formule de calcul se folosesc și pentru dozarea carotenoidelor. Diametrul cuvelor trebuie să fie de 1 cm.

2.4.1. DOZAREA VITAMINEI A_1 DIN SÂNGE

Se iau 10 ml sânge, care se pun într-un mojar. Peste sânge se adaugă Na_2SO_4 anhidru și se mojarează până se obține prin frecare o pudră uscată. Se toarnă apoi 40 ml etanol absolut și se continuă mojarrarea. Se adaugă apoi un amestec de eter etilic și eter de petrol în raport de 1 : 1 și se agită soluția ce se obține și chiar se continuă mojarrarea. Se decantează apoi soluția cu extractul de vitamină și se spală de 2—3 ori cu 40 ml amestec de solvenți, decantând soluția de fiecare dată din mojar. Extractele vitaminice se unesc și se evaporă solvenții până la sec. Reziduul obținut se reia într-un volum mic de eter de petrol și se fotometrează la 328 nm.

2.4.2. DOZAREA VITAMINEI A_1 DIN ȚESUT HEPATIC

Se cântărește 1 g țesut hepatic și se mojarează cu 5 g nisip de cuarț. Se adaugă apoi Na_2SO_4 anhidru și se mojarează până ce se obține o pudră uscată. Se adaugă apoi 20 ml etanol absolut, se continuă mojararea și apoi se face extracția cu eter de petrol și eter etilic, în cantitățile arătate la sânge, după care se face spectrofotometrarea.

2.4.3. DOZAREA VITAMINEI A_1 DIN LAPTE ȘI SMÂNTÂNĂ

Se pun într-o pâlnie de separare 100 ml lapte nefiert peste care se adaugă 100 ml etanol absolut și se agită 2—3 minute. Se agaugă apoi amestecul de eter etilic și eter de petrol, în raport de 1 : 1 și se agită

Scanned with OKEN Scanner

câteva minute. Apoi se lasă în repaus 15 minute. Se decantează soluția și se reia extracția de 2 ori cu 50 ml din amestecul de solvenți menționați. Extractele se reunesc și se spală de 8—10 ori cu apă distilată. În soluția vitaminică se adaugă 1—2 g de Na_2SO_4 și se evaporă solvenții la sec. Peste reziduul obținut se toarnă un volum cunoscut de eter de petrol, care se agită cu reziduul. Soluția limpede se spectrofotometrează, exprimând conținutul vitaminei A_1 în µg/g.

Din smântână se iau 10 ml peste care se adaugă 50 ml etanol absolut și apoi 10 ml amestec de solvenți, continuându-se restul operațiilor ca la dozarea retinolului din lapte.

2.4.4. DOZAREA VITAMINEI A_1 DIN MEDICAMENTE

Pentru dozarea vitaminei A_1 se ia soluția uleioasă de vitamina A_1 obținută din diferite preparate farmaceutice, se adaugă apoi un anumit volum de etanol absolut și se citește extincția la 326 nm în cuve de 1 cm. Conținutul vitaminei A_1 se calculează după formula:

$$UI/g = \frac{E \cdot 100 \cdot 1900}{g \cdot 0{,}4}$$

în care:

E este extincția soluției la 326 nm;
g — cantitatea luată în lucru (g);
1 900 = coeficient de transformare în UI

Dozarea vitaminei A_1 din produsele naturale menționate s-a făcut după ENESCU și colab. (1990), cu modificări și completări din partea autorului.

Testele biologice constau în aprecierea scăderii în greutate a șobolanilor în stări de avitaminoză, modificări keratinice ale țesuturilor epiteliale ale animalelor de experiență, apariția unui estru fals la șobolancele castrate supuse unui regim de avitaminoză etc. Se urmărește de asemenea apariția unor celule keratinizate în secrețiile vaginale ale șobolancelor carențate.

Testele clinice și terapeutice urmăresc modificarea unor diferiți indicatori la om, cum ar fi adaptarea de la lumină la întuneric etc.

Valorile normale ale retinolului la om sunt de 130 UI/100 ml plasmă. La un conținut de 70 UI/100 ml se realizează nivelul minim al stării de hipovitaminoză. Se urmăresc de asemenea simptomele care apar în cazul hipervitaminozei provocate prin administrarea per sos a unor doze de 200 000—500 000 UI vitamina A_1.

Unele metode biologice constau în determinarea cantității de vitamina A_1 necesară pentru înlăturarea simptomelor care apar în avitaminoza experimentală. Ca standard al activității vitaminice A_1 se adoptă frecvent acetatul de retinol, care se conservă bine la temperaturi joase și în vid.

În tabelul 2.2 se prezintă principalele reacții folosite la identificarea și dozarea vitaminelor A.

Scanned with OKEN Scanner

Tabelul 2.2

Reacții pentru identificarea și dozarea vitaminelor A (după CHIOSA și colab., 1956)

Reactiv utilizat	Culoarea produsului obținut prin acțiunea reactivilor cu vitamina A
Acid sulfuric concentrat	Albastru-închis, intens
Vitamina A1—2 mg în ml cloroform + + H_2SO_4 concentrat	Verde, apoi albastru-închis
Vitamina A soluție în cloroform + 1—2 picături HNO_3 fumas	Albastru, apoi verde
Acid formic 95%	Insolubil la rece și la cald, incolor
Acid dicloracetic	La rece, după 1—2 minute soluția devine violetă
Acid cloracetic	Slab verzui, greu solubil
Acid tricloracetic	Albastru-închis la rece, reacție instantanee
Acid tricloracetic (0/3 g în 1 ml cloroform + 2 mg vitamina A	Galben, care trece în albastru
Triclorură de arsen	Roșu care trece repede în albastru
Triclorură de stibiu	Albastru intens închis
Triclorură de stibiu în cloroform + 1—2 mg vitamina A în 2 ml reactiv	Brun, imediat albastru-închis, apoi violet stabil
Tetraclorură de staniu (topită)	Albastru, violet-albastru, violet și cald

2.5. RĂSPÂNDIRE, ABSORBȚIE ȘI NECESITĂȚI ZILNICE

Vitaminele se găsesc atât în regnul animal, cât și în cel vegetal. Provitaminele (carotenoidele) predomină în regnul vegetal, iar vitaminele în stare liberă, sub formă de complecși sau de esteri se găsesc în cantitate mai mare în produse alimentare animaliere. Moleculele carotenoidelor provitaminice, așa după cum s-a menționat anterior, nu au activitate vitaminică ca atare, ci numai în urma transformării acestora în vitamine A, prin reacții enzimatice care au loc predominant în intestinul subțire și în ficat.

Cele mai bogate surse de vitamine A de origine animală le formează uleiul de pește (2,5—40 mg%) și ficatul animalelor de abator (30 mg%). Laptele și derivatele acestuia, în special untul și gălbenușurile ouălor reprezintă și acestea surse importante de vitamine A. Cele mai importante surse de carotenoide provitaminice A le constuie morcovii (6—8 mg%), fructele de cătină și măcesele (6—7 mg%), fructele citrice (5 mg%), florile și fructele de bostan (4—5 mg%), spanacul și varza (3—4 mg%), ardeiul și polenul (2—3 mg%), diferite fructe și legume (0,5—1 mg%).

Cantitatea cea mai mare de vitamina A_1 se găsește în grăsimea din ficatul peștilor marini (60 000 µg/100 g), procurată sub formă de ulei de pește sau untură de pește. Peștii marini își procură hrana din planctonul marin, care reprezintă hrana de bază a acestora. De asemenea, ficatul animalelor de fermă și a celor sălbatice are un conținut ridicat în vitamina A_1. Ficatul ursului polar conține 20 000—50 000 UI/kg corp. În tabelul 2.3 se prezintă cantitatea de vitamină A din 100 g de diferite alimente.

Scanned with OKEN Scanner

Tabelul 2.3

Conținutul vitaminei A_1 în 100 g alimente exprimat în γ %
(după ENESCU și colab., 1990)

Aliment	Conținut exprimat în γ%
Lapte de vacă	250
Smântână	350
Unt	3 050
Brânză de vacă	100
Brânză de oi	1 000
Gălbenuș de ou	5 000
Ficat	60 000
Rinichi	1 500
Pește	10 000
Carne	100
Untură de pește	3 000 000

Carnea, produsele lactate, gălbenușul de ou, viscerele, au un conținut mai scăzut în vitamina A_1 în comparație cu ficatul și uleiul de pește. În general conținutul vitaminei A_1 este mai mare în produsele alimentare vara, când animalele consumă iarbă, bogată în carotenoide, decât iarna, când animalele consumă furaje uscate, sărace în carotenoide provitaminice.

Nu conțin vitamina A_1 uleiurile vegetale, untura, slănina, seul, margarina etc.

Alimentele congelate pierd 5—10% din vitamina A_1 la o depozitare de un an la —23°C. Prepararea alimentelor nu determină degradarea sensibilă a vitaminelor A_1, cu excepția grăsimilor prăjite.

Omul își procură vitaminele A prin hrană, atât sub formă de provitamine, cât și sub formă de vitamine în stare liberă, sau sub formă de compuși vitaminici.

Animalele ierbivore își procură vitaminele A prin intermediul carotenoidelor provitaminice, pe care le transformă în vitamine. Animalele carnivore își procură vitaminele A din hrana de origine animală. Trebuie subliniat că sursa primară de vitamine A pentru animale o formează plantele, singure capabile de biosinteza carotenoidelor. Nici un animal nu poate biosintetiza vitamina A „de novo", decât numai din carotenoidele provitaminice ingerate din hrană.

Vitaminele A se găsesc în alimente predominant sub formă de esteri. Aceștia vor fi hidroizolați în intestinul subțire, la un pH optim de 8,6 sub acțiunea retinolester-hidrolazei pancreatice. Apoi sub formă de retinol vor fi absorbite prin intestin (porțiunea superioară și mijlocie a intestinului subțire) în sistemul limfatic, unde vor fi din nou esterificate cu acizi grași, în special cu acidul palmitic la un pH de 6,6. O parte din esteri se vor acumula în chilomicroni. Sub formă esterică (palmitatul de retinol, stearat de retinol etc.), retinolul este transportat prin limfă la organele de depozit, cu ajutorul predominant al lipoproteinelor cu densitate mică și al chilomicronilor. Majoritatea retinolului esterificat se depune în ficat, în celulele Kupfer. La șobolan, aproximativ 95% din retinol se depune în ficat sub formă de ester (palmitat de retinol și numai 5% în stare liberă.

Scanned with OKEN Scanner

În funcție de necesitățile organismului, esterii retinolului depozitați în ficat, sunt hidrolizați, iar retinolul se cuplează cu proteina purtătoare (RPB) și prin circulația sanguină ajunge la celule și țesuturi (epitelii, ochi, creier, glande, mușchi etc.), unde este necesar proceselor metabolice. O parte se menține în sânge, în limite normale, pentru aprovizionarea rapidă a celulelor cu vitamina A_1. Unii cercetători (FRIDGE și colab., 1974) susțin că nu retinolul este forma cea mai activă a vitaminei A la mamifere și păsări, ci probabil retinalul și acidul retinoic, sau derivații acestora. Acești autori susțin că atât retinalul, cât și retinolul sunt convertiți în sânge și limfă în acid retinoic.

Retinalul se poate reduce în retinol sub acțiunea unei aldehidreductaze nespecifice, care să conțină ca și coenzimă NADH sau NADPH. Este posibil ca o parte din retinolul provenit din alimente să se oxideze în acid retinoic, chiar în epiteliul intestinal, precum și în ficat. Retinolul este ușor excretat, o parte prin bilă sau prin fecale. Acidul retinoic se combină cu acizii β-glucuronici și formează β-glucuronoidele acidului retinoic, din care o parte vor fi transportate prin sângele portal la ficat (ENESCU, 1990).

Vitamina A_1 se găsește sub formă de palmitat în ficat, intestin și în sistemul limfatic. În sânge se găsește predominant în stare liberă (legat de proteina purtătoare), iar în cantități mici sub formă de retinal și acidul retinoic β-glucuronat. În mod normal, urina nu conține retinol, dar acesta apare în cazuri patologice (nefrită cronică).

Cantitatea de retinol necesar zilnic oamenilor este în medie de 1,5—2,5 mg (5 000—8 300 UI). Ea variază în funcție de vârstă, starea de sănătate, activitatea fiziologică etc. Pentru copii, conținutul retinolului trebuie să fie cuprins între 1500 și 3000 UI, la adolescenți între 300 și 5 000 UI, femeile gravide trebuie să consume zilnic aproximativ 6 000—7 000 UI, iar femeile care alăptează 8 000—9 000 UI.

În tabelul 2.4 se prezintă activitatea vitaminică A, în procente, furnizată de 100 g alimente.

Absorbția și eficiența vitaminei A_1 din produsele alimentare este în raport invers proporțional cu mărimea particolelor în care se găsesc.

Hidroliza și esterificarea vitaminelor este inhibată de NaF, arsenit de sodiu, dietilamină, p-nitrofenil fosfat, iar numai esterificarea este inhibată de taurocolatul de sodiu, clorura de calciu. Vitamina A_1 este mai ușor absorbită la nivelul intestinului din soluții apoase decât din soluții uleioase (DELVIN, 1986).

Vitamina E stimulează absorbția și depozitarea vitaminelor A în ficat, datorită caracterului său antioxidant, având un rol de protecție în special la nivelul intestinului. Tocoferolii împiedică oxidarea vitaminelor A în organismele animale.

Vitaminele F au în schimb o acțiune oxidantă asupra vitaminelor A, provocând oxidarea acestora înainte de absorbția din intestin.

Colina stimulează depozitarea vitaminelor A în ficat. În absența colinei se produce o consumare rapidă a depozitelor de vitamina A din ficat.

Vitaminele A ajung în sânge după 3—5 ore de la administrarea per os, iar provitaminele după 7—8 ore, fiind transportate sub formă legată de globulinele serice și apoi depozitate; carotenoidele în țesutul adipos, iar vitaminele A, în proporție de 90—95% sub formă de esteri

Scanned with OKEN Scanner

Tabelul 2.4

Activitatea vitaminică A furnizată de 100 g alimente necesară omului adult, exprimată în procente (după ENESCU, și colab., 1990)

Sub 10%		Între 10—25%		Între 25—50%	Peste 50%	
Lapte de vacă	2,0	Smântână Brânză moale	10,0 20,0	Brânză tare 28	Unt	60
Pasăre Pește	8,0 2,0	Ou	20,0	—	Ou praf Ficat de vacă și porc Ficat de vițel Untură de pește	60 250 1 000 1 200
Mălai Legume uscate	3,0 2,0	—		—	—	
Lăptucă Măsline Fasole verde Cartofi	4,0 6,0 7,4 8,4	Mazăre boabe Roșii Sparanghel	11,0 13,0 20	—	Sfeclă Cicoare Morcov Varză Spanac	56 60 60 70 152
Pere Mere Fructe proaspete Prune	0,4 1,4 5,4 7,0	Cireșe Piersici Caise uscate	12,0 12,0 20,0	Caise 45 proaspete	—	

Notă: Pentru alimentele vegetale cifrele indică conținutul în β-caroten

palmitici în ficat, unde ajung la o concentrație medie de 300 μg/g (TIMAR, 1984).

În plasmă, retinolul se găsește în stare liberă sub formă de alcool, în proporție de 80—85% și numai 10—17% sub formă de ester palmitic. Conținutul mediu al retinolului în plasmă este de aproximativ 130 UI/ml, iar al carotenoidelor de 13 UI/100 ml.

Transportul vitaminelor A către ficat se face sub formă de esteri de către lipoproteinele cu densitate mică în proporție de 80%, de chilomicroni în procent de 7,5% și de lipoproteinele cu densitate mai mare (Sf=3—9), în proporție de 8,6%. Transportul de la ficat spre diferite țesuturi se face de lipoproteine cu densitate mare (20%) și în proporție de 80% de către proteinele specifice retinolului RBP (retinol binding protein).

La persoanele cu malnutriție gravă, cu conținut scăzut de proteine serice, scade și nivelul vitaminemiei A datorită insuficienței proteinei transportoare (RBP). Substanțele cancerigene, cum sunt, 1,2,5,6-dibenzantracenul (DBA), metilcolantrenul (MC), benzopirenul (BP) etc., scad rapid nivelul vitaminelor A din ficat. Depozitarea normală a vitaminelor în ficat, (60—120 μg/g) asigură necesitățile umane timp de aproape 6 luni.

Pe cale experimentală s-a arătat că nevoile bărbaților în vitamine A sunt mai mari decât ale femeilor, cu excepția perioadelor de gravi-

Scanned with OKEN Scanner

ditate și alăptare. Consumul de vitamine A este mărit în cazuri de diabet, hipertiroidism, febră etc., precum și în cazul infecțiilor hepatice și intestinale, când digestia și absorbția vitaminelor și a grăsimilor sunt reduse.

2.6. PROVITAMINE A

2.6.1. FELUL ȘI POTENȚIALITATEA VITAMINICĂ A CAROTENOIDELOR

Pigmenții carotenoidici reprezintă singura sursă naturală din care omul și animalele își pot sintetiza vitaminele A, care au un rol important în formarea pigmenților fotosensibili implicați în procesul vederii, în creșterea și dezvoltarea organismelor, protecția și refacerea țesuturilor epiteliale, reducerea sterilității etc. Așa după cum s-a menționat anterior, omul și animalele nu sunt capabile să-și sintetizeze vitaminele A din compuși anorganici. Ele însă sunt capabile să absoarbă și să depoziteze vitaminele A din hrană, sau să le sintetizeze din unele carotenoide, care se numesc *provitamine A*.

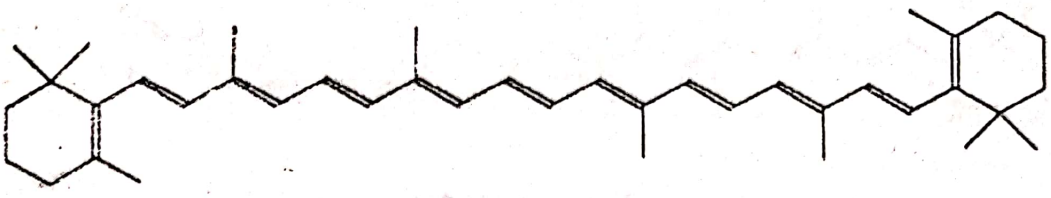
Pentru ca un pigment carotenoidic să poată fi transformat în vitamina A_1 trebuie să conțină un inel β-iononic nesubstituit, să aibă un sistem polienic normal, să prezinte configurație trans, iar catena laterală să conțină cel puțin nouă atomi de carbon (NEAMȚU și colab., 1986).

Principala carotenoidă provitaminică A o constituie β-carotenul. Dintr-o moleculă de β-caroten se pot obține maximum 2 molecule de vitamina A_1. Din celelalte carotenoide provitaminice (α-caroten-γ-caroten, criptoxantină, apocarotenali, echinenonă etc.) se poate obține o singură moleculă de vitamina A_1 dintr-o singură moleculă de pigment. Formula principalelor carotenoide provitaminice A se prezintă în figura 2.5.

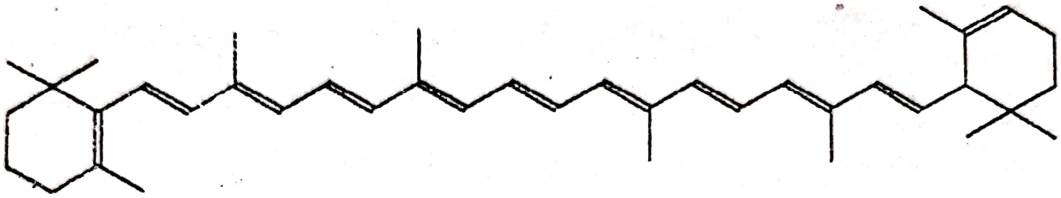
Numărul carotenoidelor provitaminice este cu mult mai mare decât cele prezentate în figura 2.5., fiind cuprins între 50 și 60 carotenoide și de apocarotenali (SIMPSON și colab., 1981). Compușii dehidrogenați la nivelul inelului iononic, în pozițiile 3, 4 sau 3', 4' au o activitate vitaminică mai mică, dar nu sunt inactivi. De asemenea, mono- sau diepoxizii, ori furanoizii, cu oxigenul la carbonii C-5—C-6, respectiv C-5—C-8, au activitate vitaminică, chiar dacă este mai slabă decât a altor carotenoide.

JEANA GROSS și P. BUDOWSKI au raportat în 1966 că unii pești din lacuri formează vitamina A_1 din izozeaxantină, cantaxantină, astaxantină (4-oxocarotenoide), care sunt derivați oxigenați ai β-carotenului. Ulterior s-a stabilit că și afanina, mixoxantina și afamicina extrase din alge sunt provitamine A, precum și hepaxantina extrasă din ficat.

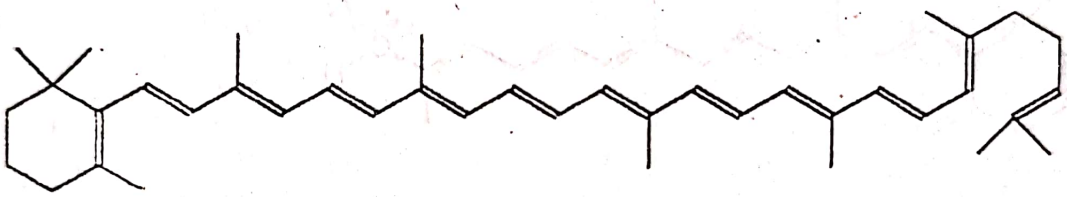
În comparație cu acetatul de retinol, a cărui activitate vitaminică se apreciază a fi de 100%, activitatea vitaminică a 5,6-epoxidului acidului retinoic, reprezintă 80%, fapt confirmat prin experimentări în creșterea șobolanilor. Deschiderea inelului β-ioinonic, cu formare de *secocarotenoide*, micșorează mult activitatea vitaminică a acestor compuși, dar nu o anulează. În privința carotenoidelor, sunt mai activi cei cu grupări carbonilice sau carboxilice de la atomii de carbon C—3',



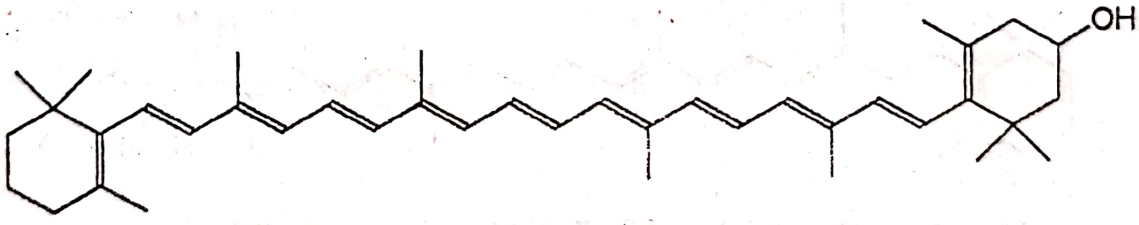
ß - Caroten



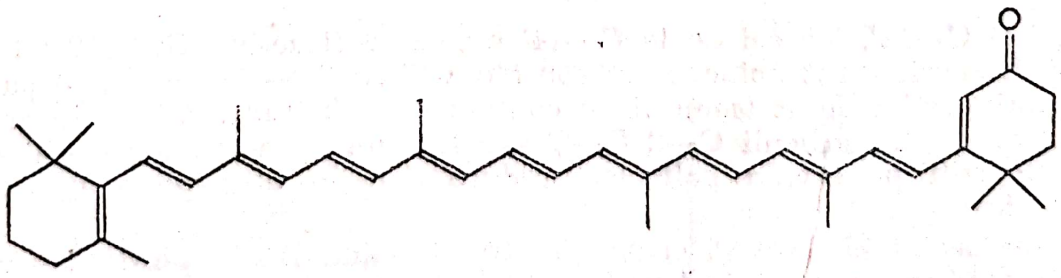
∝ - Caroten



ɣ - Caroten



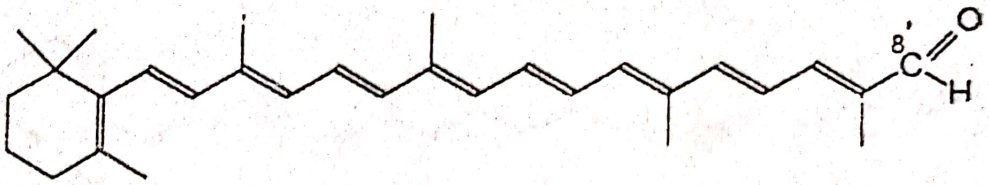
Criptoxantină



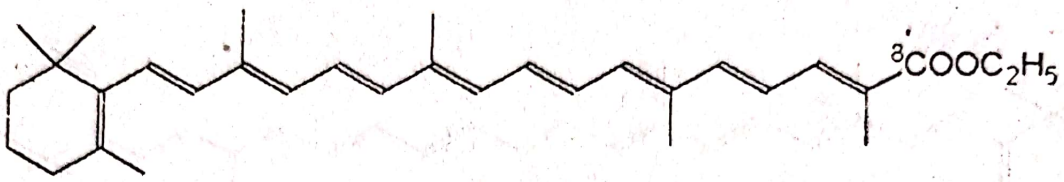
Echinenonă

Fig. 2.5. Principalele carotenoide provitaminice A

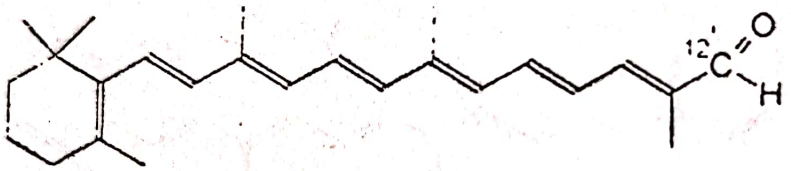
Scanned with OKEN Scanner



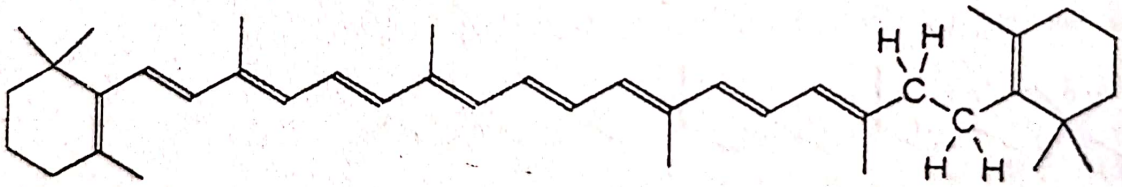
ß - apo - 8' - carotenal



Esterul etilic al acidului ß - apo - 8' - carotenoidic



ß - apo - 12' - carotenal



ß - Zeacaroten

Fig. 2.5. (continuare)

C—10' și C—12', iar cei de la C—14' nu par a fi activi (GOODWIN a, 1965). Izomerii carotenoidelor cu configurație *cis* (cis-cis, cis-trans) sunt mai puțin activi decât izomerii cu configurație *all-trans*. Adiția de grupări metilice la carbonii C—2 C—2' sau înlocuirea radicalilor metili cu radicali etili pe catena polienică, reduce dar nu distruge activitatea vitaminică.

Anhidroluteina a fost convertită în vitamina A_2 în pești, dar nu și în corpul uman. Dacă în hrana peștilor *Scobranchus fossilis* se adaugă luteină, se constată o creștere a 3-dehidroretinolului depozitat în ficat (BAURA și colab., 1973).

Scanned with OKEN Scanner

Tabelul 2.5

Activitatea vitaminică a unor carotenoide provitaminice A, în UI/g

Carotenoide	Activitatea vitaminică (UI/g)
β-caroten	1 667 000
α-caroten	880 000
γ-caroten	750 000
Echinenonă	890 000
Cantaxantină	950 000
β-apo-8′-carotenal	1 100 000
Acid β-apo-8′-carotenoidic	420 000
β-apo-12′-carotenal	2 000 000
β-zeacaroten	420 000

În tabelul 2.5 se prezintă valorile medii ale activității vitaminice ale carotenoidelor, obținute de autori în testul de creștere a șobolanilor (GOODWIN, b, 1976). β-carotenul este cel mai important pigment carotenoidic provitaminic A, atât prin faptul că dintr-o moleculă de pigment se pot obține două molecule de vitamina A_1, cât și prin larga sa răspândire în natură. Pentru a ușura în practica de producție exprimarea potențialității vitaminice a carotenoidelor, IUPAC a propus ca 1 μg de β-caroten să fie echivalent cu activitatea unei unități internaționale (UI) de vitamina A_1, iar 1 μg de β-caroten să fie echivalat cu 0,167 μg de retinol sau cu 0,56 UI de vitamina A_1. Din nefericire în multe tabele alimentare se folosesc coeficienți diferiți de conversiune a carotenoidelor în vitamine A. De asemenea, s-a constatat că potențialitatea vitaminică a carotenoidelor la diferite animale variază între anumite limite. Astfel, potențialitatea β-apo-8'-carotenalului la șoarece este de 1 100 000 UI/g, iar la puiul de găină de abia 658 000 UI/g.

Potențialitatea vitaminică a unor carotenoide provitaminice tipice, exprimată în procente se prezintă în tabelul 2.6.

Tabelul 2.6

Activitatea vitaminică A a unor carotenoide provitaminice tipice, exprimată în procente

Carotenoide provitaminice A	Activitate vitaminică (%)
β-caroten	100
α-caroten	40—50
γ-caroten	42—50
β-zeacaroten	20—40
3,4-dehidro-β-caroten	75
β-caroten-5′,6′-monoepoxid	21
β-caroten-5′,8′-monofuranoid	50
β-semicarotenonă	10—15
β-apo-8′-carotenal	72
Acid β-apo-carotenoidic	20—25
Anhidroluteină	21

Scanned with OKEN Scanner

Tabelul 2.7

Conversia unui miligram de B-caroten în vitamina A la diferite specii de animale, exprimată în UI

Specie	Conversia a 1 mg β-caroten în vitamina A_1, exprimată în UI
Standard	1667 UI retinol
Bovine de lapte	536—1667
Bovine de carne	333—476
Cal în creştere	555
Câine	833
Ovine	400—476
Păsări de curte	536—1667
Porcine	475—533
Şoarece şi nurcă	Nu utilizează carotenoide

Datorită însă absorbției și transformării limitate a carotenoidelor în vitamine A, adevărata valoare provitaminică a carotenoidelor este puțin mai redusă. Trebuie de asemenea să luăm în considerare că în produsele alimentare, β-carotenul trans-total, este însoțit de diferiți izomeri conformaționali (neo-U-β-caroten, neo-B-ß-caroten etc.), care au activitate vitaminică mai mică.

Cantitatea de vitamină A care se formează practic dintr-un miligram de ß-caroten, în corpul unor animale de fermă, se prezintă în tabelul 2.7.

Întrucât există numeroși factori interni și externi care influențează transformarea carotenoidelor în vitamine A, este mai rezonabil să se întocmească tabele cu conținutul în ß-caroten din alimente și apoi să se exprime potențialitatea de vitamine A în UI/g.

În tabelul 2.8 se prezintă conținutul carotenoidelor din fructe și legume și echivalența lor în UI/g.

Tabelul 2.8

Conținutul carotenoidelor din fructe şi legume şi echivalența lor în vitamina A_1 exprimată în UI/g

Fructe şi legume	Conținutul carotenoidelor (mg/kg)	Echivalența în UI de vitamina A_1
Agrișe proaspete	1,8	3,0
Ananas	0,6	0,7—1,0
Avocado	1,0	1,7—2,9
Banane proaspete	2,0	3,3
Caise proaspete	15	25—27
Caise uscate	36	60—109
Căpșuni proaspeți	0,3	0,5—0,6
Cireșe proaspete	1,2	2,0
Mandarine	1,0	1,7—4,2
Măsline verzi	0,5	0,8—2,0
Mere proaspete	0,3	0,5—0,9
Mure proaspete	1,0	1,7—2,0
Pepene galben proaspăt	20	33—34
Pere proaspete	0,1	0,2
Piersici proaspete	5,0	13,3—33

Scanned with OKEN Scanner

Tabelul 2.8 (continuare)

Fructe și legume	Conținutul carotenoidelor mg/kg)	Echivalența în UI de vitamina A_1
Piersici uscate	20	33—39
Portocale	0,5	0,8—2
Prune proaspete	2,2	3—3,7
Prune uscate	10	17—21,7
Rubab	0,6	1,0
Zmeură proaspătă	0,8	1,3
Vișine	5,0	6,6—8,3
Andive	20	33
Asparagus	5,0	8,3—9
Bostan (vara)	18	30
Fasole verde	5	5—5,4
Lăptucă	10	17
Mazăre	3	5—5,4
Mentă	110	183
Morcovi	70	105—116
Muștar frunze verzi	50	83
Napi verzi	60	63—100
Pătrunjel	80	133
Roșii	7	8—10
Sfeclă verde	50	51—83
Spanac frunze	60	81—100
Țelină	20	33
Varză	4	5,2—6,7
Varză de Bruxelles	4	5,2—6,7
Varză creață	50	83
Vinete	0,3	0,5—0,6

Conținutul redus al vitaminelor A și a carotenoidelor provitaminice din hrană un timp mai îndelungat, după epuizarea depozitelor din ficat, determină instalarea stării de hipovitaminoză, care determină apariția unor importante dereglări metabolice.

2.6.2. ABSORBȚIA ȘI TRANSFORMAREA CAROTENOIDELOR ÎN VITAMINE A

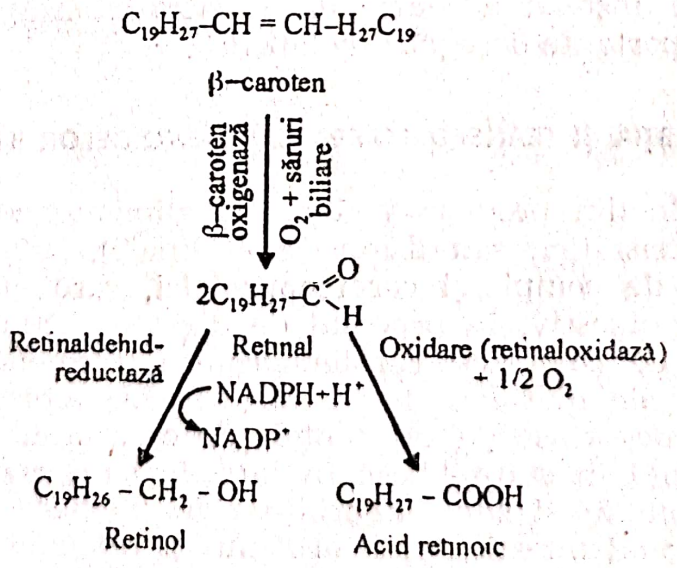
Carotenoidele din produse vegetale și alimente, aflate în stare liberă (în stare cristalină sau dizolvate în lipide), sub formă de esteri sau sub formă de complecși carotenoproteici, carotenolipoproteici etc., ajunse în tubul digestiv, în procesul de digestie, acționează asupra lor sau sub formă de complecși carotenoproteici, carotenolipoproteici etc., care prin reacții de hidroliză, fac ca toate carotenoidele să se găsească în stare liberă, desprinse de substanțele de care erau legate. Carotenoidele ajunse astfel în stare liberă în intestin sunt apoi solubilizate de către sărurile biliare și sunt absorbite prin membrana intestinală. In epiteliul membranei intestinale, β-carotenul și celelalte carotenoide provitaminice sunt activate de către o carotenoiddehidrogenază, după care urmează o clivare oxidativă a catenei interne, rezultând două molecule de retinal. Clivarea oxidativă a catenei carbonice a carotenoidelor se face sub acțiunea carotenoxigenazei (15,15'-oxigenaza) cu oxigen molecular, care în cazul ß-carotenului reacționează la nivelul dublei legături centrale de la atomii de carbon C-15—C-15' cu formarea unui

Scanned with OKEN Scanner

peroxid intermediar (15, 15'-peroxid-β-caroten), care rapid se clivează formând două molecule de retinal.

Activitatea caroten-oxigenazei este influențată de numeroși factori, inclusiv de conținutul proteinelor din alimente (dietă), respectiv furaje. O reducere a proteinelor ingerate, micșorează drastic transformarea carotenoidelor provitaminice în vitamina A, la nivelul intestinului subțire. O mică parte din retinalul format, este oxidat în pereții intestinali la acid retinoic, care trece în sânge, iar cea mai mare parte din retinal este redus la retinol, proces ce nu necesită enzime specifice. În mucoasa intestinului de șobolan, reducerea retinalului la retinol a necesitat $NADH+H^+$ sau $NADPH+H^+$. Cu toate că enzima ce catalizează această reacție nu este o retinaldehidrogenază specifică, deoarece poate reduce și alte aldehide cu coenzimele menționate, enzima nu este o alcool-dehidrogenază clasică, pentru că nu oxidează alcoolul. Similar β-carotenului se comportă și celelalte carotenoide provitaminice, cu formarea unei singure molecule de retinal, care este apoi redus la retinol, esterificat și transportat la ficat, unde se depozitează. Dacă clivarea oxidativă a catenei interne a carotenoidelor nu se produce la mijlocul moleculei, ci mai aproape de unul din inelele iononice rezultă carotenali, care de asemenea, au activitate vitaminică A. Schema acestor transformări se prezintă în figura 2.6.

Până în prezent nu s-a pus în evidență 15,15'-peroxidul de β-caroten, compus intermediar instabil, care printr-o clivare oxidativă, sub acțiunea carotenoxigenazei, determină ruperea legăturii covalente centrale cu formarea a două molecule de retinal, fapt pentru care unii autori (E. CRISTEA și colab., 1991) prezintă scindarea oxidativă a carotenoidelor conform următoarei relații:



Un alt mecanism posibil de scindare a carotenoidelor în vitamine A constă în fixarea a două molecule de apă la dubla legătură din mijlocul catenei carbonice a carotenoidelor, cu formarea unui compus dihidroxilat, care prin ruperea legăturii covalente dintre C-15—C-15' sub

Scanned with OKEN Scanner

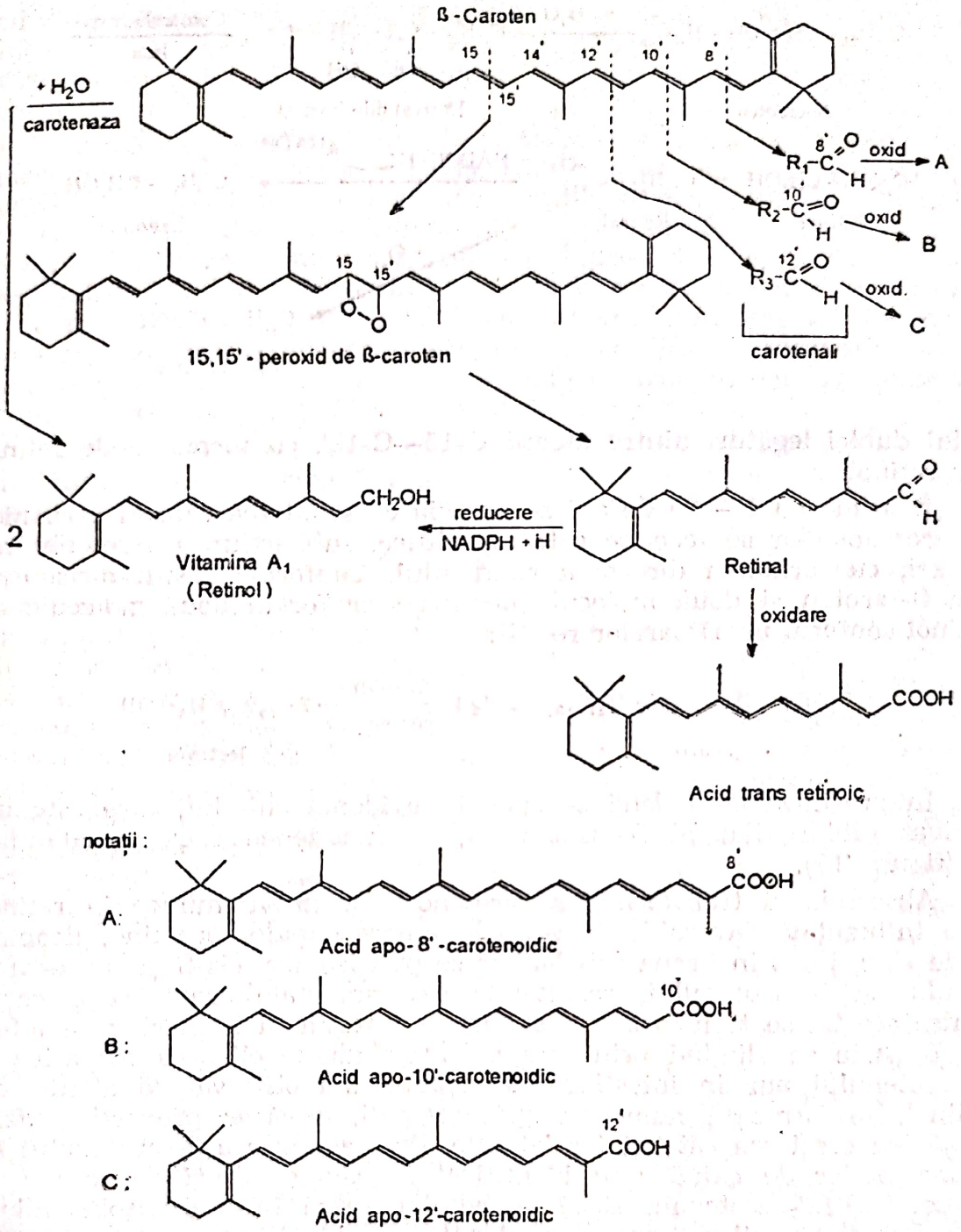
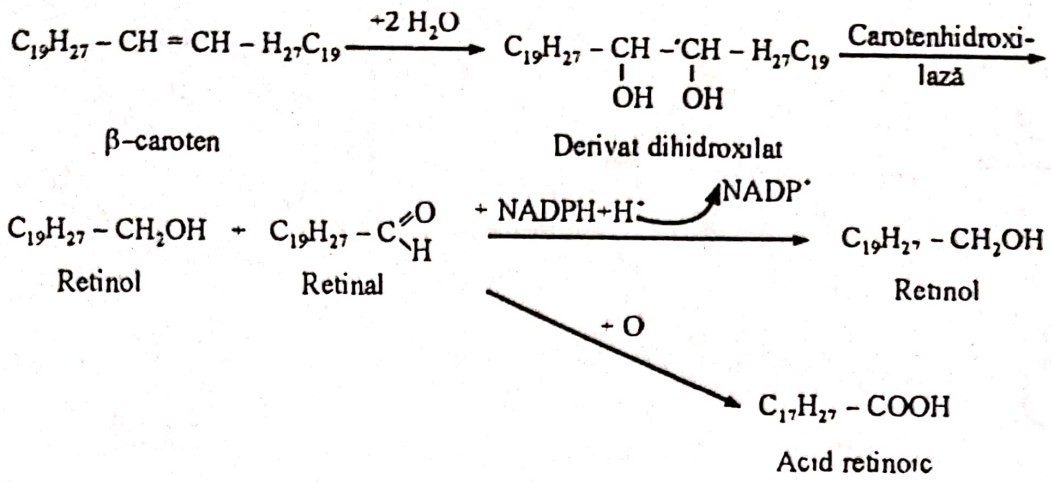


Fig. 26 Schema transformării carotenoidelor în carotenali

acțiunea carotenhidroxilazei, se transformă într-o moleculă de retinol și una de retinal, care va putea fi ulterior redusă la retinol, sau oxidată la acid retinoic.

Prin cercetări experimentale s-a stabilit că dacă scindarea catenei interne a carotenoidelor nu se face la mijlocul moleculei (C-15—C-15'), ci la nivelul unor duble legături mai aproape de inelele iononice, compusul cu catenă mai lungă ar suferi reacții de ß-oxidare, până la ni-

Scanned with OKEN Scanner



velul dublei legături dintre atomii C-15—C-15', cu formarea de retinal sau retinol.

În urmă cu 10—20 de ani se aprecia că scindarea catenei carbonice a carotenoidelor se face pe cale hidrolitică, sub acțiunea carotenhidroxilazei, cu formarea directă a retinolului. Conform acestui mecanism, din ß-caroten și două molecule de apă s-ar forma două molecule de retinol conform următoarelor relații:

$$C_{19}H_{27}-CH=CH-H_{27}C_{19} + 2\,H_2O \xrightarrow{\text{Caroten-hidroxilază}} 2\,C_{19}H_{27}CH_2-OH$$

β-caroten — Retinol

În grăsimea de balenă s-a pus în evidență chitolul, care este un derivat dihidroxilat al ß-carotenului, ce funcționează ca provitamină A_1 (figura 2.7).

Absorbția și transformarea carotenoidelor provitaminice în retinal este influențată favorabil de sărurile biliare, lipide, proteine, licopină și de zinc. Dacă în hrana șobolanilor se pun izomeri cis-trans ai α-carotenului și ß-carotenului, rezultatele experimentale arată că o parte dintre aceștia se transformă în stomac și intestin în izomeri trans-total, iar o parte se elimină prin fecale. Urmărindu-se clivarea oxidativă a ß-carotenului pur în intestinele de iepure, s-a observat că alături de retinal, se formează numeroși apocarotenali, a căror proporție descrește cu creșterea catenei lor laterale. Prin adăugarea β-carotenului în hrana puilor de găină s-au identificat în sânge alături de retinal și β-apo-8'-10'12'-carotenali. Dacă se administrează în hrana șobolanilor, iepurilor și păsărilor ß-apo-8'-carotenal, s-au identificat în intestin aci-

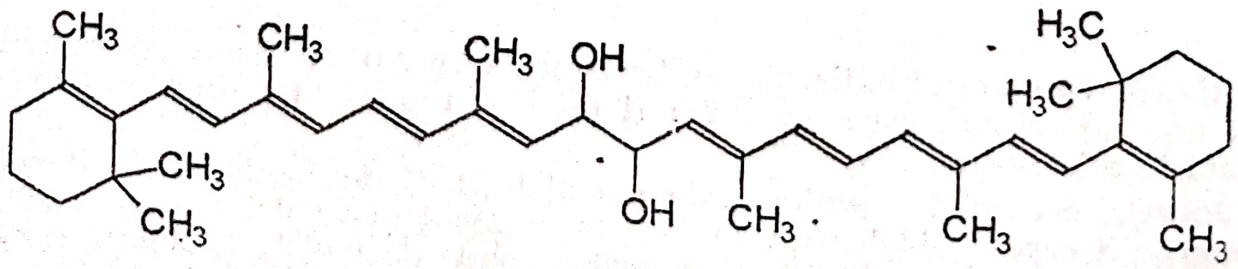


Fig. 2.7. Structura moleculară a chitolului

zii ß-apo-10' şi 12'-carotenoidici, fapt ce denotă că ß-apo-8'-carotenalul, care are o catenă laterală mai lungă a suferit degradări ß-oxidative, cu formarea acizilor carotenoidici, care au catene carbonice mai scurte.

Absorbţia carotenoidelor şi a derivaţilor acestora depinde într-o mare măsură şi de specia animală. Omul şi maimuţa, au cea mai mare putere de absorbţie a carotenoidelor din hrană, atât în ce priveşte structura moleculară a acestora, cât şi conţinutul lor. Capra şi pisica absorb foarte greu atât carotenoidele hidrocarburice, cât şi derivaţii lor oxigenaţi. Bovinele absorb mai uşor carotenoidele hidrocarburice şi elimină în mare parte xantofilele. Păsările se comportă invers bovinelor. Ele absorb mai uşor xantofilele biciclice cu structură α- şi ß-iononică pe care le depozitează în gălbenuşurile ouălor, grăsimea corpului, creastă, penaj, decât carotenoidele hidrocarburice.

La om absorbţia carotenoidelor se realizează relativ lent. O parte din carotenoidele neabsorbite se distrug în peretele intestinal, în tubul digestiv, fiind eliminate prin fecale. Absorbţia carotenoidelor este substanţial îmbunătăţită în prezenţa lipazei intestinale, a bilei şi a lipazei panceratice, care emulsionează carotenoidele şi astfel uşurează absorbţia lor. Uleiul de parafină micşorează absorbţia, atât a carotenoidelor, cât şi a vitaminelor A. Conţinutul carotenemiei este influenţat şi de sex. Astfel, la om conţinutul mediu al carotenoidelor totale este la bărbaţi de 71 µg/100 ml ser, iar la femei de 56,6 µg/100 ml ser, cu excepţia perioadelor de graviditate şi lactaţie. Carotenemia la nounăscuţi este în medie de 23 µg/100 ml ser. Pe baza a numeroase cercetări experimentale s-a stabilit că afinitatea carotenoidelor faţă de proteinele plasmatice ar avea următoarele valori procentuale: ß-globuline 50%, albumine 20%, α_2-globuline 10%, α_1-globuline 6,7%. Se pare că γ-globulinele nu se combină cu carotenoidele (ENESCU, 1990).

O hrană bogată în carotenoide, administrată o perioadă îndelungată de timp, determină apariţia hipercarotenemiei, caracterizată prin îngălbenirea pielii, a ţesuturilor subcutanate, a ochilor, a grăsimii corpului etc.

Unele carotenoide sunt absorbite în mod direct, fără transformări, iar conţinutul carotenoidelor din sânge reflectă conţinutul carotenoidelor din hrană. Ele pot fi depozitate în ficat sau în alte ţesuturi şi organe, mai cu seamă în ţesuturile adipoase, piele, carne, lapte, gălbenuşurile ouălor, icre, glande suprarenale, cortex, penajul unor păsări etc. Este posibil ca o mică parte din carotenoidele provitaminice depozitate în ficat să se transforme prin clivare oxidativă, sub acţiunea carotenoxigenazei, în retinal şi apoi în retinol.

Conţinutul retinolului din sânge este dependent atât de carotenoidele provitaminice din hrană, de procesul de absorbţie şi transport, cât şi de conţinutul proteinelor plasmatice. Retinolul poate fi oxidat reversibil în retinal, iar acesta, prin oxidare ireversibilă, formează acidul retinoic, care dispare repede din sânge, întrucât contribuie la formarea unor compuşi ß-glucuronici care sunt excretaţi în bilă, de unde vor fi eliminaţi în cea mai mare parte prin fecale, iar în cantitate mică şi prin urină.

Scanned with OKEN Scanner

2.7. ROL ȘI FUNCȚII BIOLOGICE

Vitaminele A au un rol multiplu și complex la om și animale, participând la înfăptuirea a numeroase procese biochimice de mare importanță pentru viața și activitatea acestora.

Vitaminele A sunt indispensabile în procesul vederii, întrucât iau parte la biosinteza și funcționarea pigmenților fotosensibili din purpura retiniană (zona vizuală). Ele au de asemenea un rol însemnat în protejarea, vindecarea și funcționarea țesuturilor epiteliale, în creșterea și reproducerea organismelor animale, în stabilitatea membranei celulare, biosinteza hormonilor etc.

Dintre vitaminele A (retinoide) interes deosebit prezintă *retinolul*, cu rol însemnat în protecția epiteliilor și în reproducere, *retinalul*, cu rol determinant în procesul vederii, *acidul retinoic* cu rol însemnat în sinteza glicoproteinelor, în transportul oligo-glucidelor prin membranele celulare, necesare biosintezei glicoproteidelor. În acest proces, acidul retinoic suferă o izomerizare cis-trans, analogă retinalului în celulele fotoreceptoare din retină. Cercetări mai recente susțin că retinoidele ar influența și expresia genetică implicată atât în proliferarea, cât și în diferențierea mai multor tipuri de celule normale sau maligne (DEVLIN, 1986).

Vitaminele A iau parte în numeroase transformări metabolice ale glucidelor, lipidelor, protidelor și a altor compuși, în formarea sistemului osos, având interacțiuni cu alte vitamine și hormoni. Ele sunt considerate un factor de protecție pentru întreaga ectodermă (piele, epitelii și derivatele acestora) și un factor de creștere, fiind totodată indispensabile în procesul vederii.

2.7.1. ROLUL VITAMINELOR A ÎN PROCESUL VEDERII

Pentru o mai bună înțelegere a procesului vederii la om și la animalele vertebrate, vom prezenta succint unele noțiuni anatomice, fiziologice și biochimice privind structura și funcționarea ochiului, a zonei sale vizuale (purpura vizuală sau purpura retiniană) și a celulelor fotoreceptoare.

Întrucât procesul vederii este de importanță capitală pentru activitatea oamenilor și a animalelor superioare, a fost cercetat cu mare atenție încă din cele mai vechi timpuri (antichitate). Progresele obținute în cunoașterea mecanismului biochimic al vederii, s-au realizat treptat, în funcție de dezvoltarea aparaturii de cercetare, a metodelor și mijloacelor utilizate, a experienței acumulate în aceste domenii de cercetătorii (medici, fizicieni, biochimiști etc.) din diferite țări. În acest subcapitol vom prezenta pe scurt, pe baza literaturii utilizate, principalele elemente privind procesul vederii insistând asupra rolului vitaminelor în acest miraculos proces (DUMITRU, 1970, 1980; OERIU, 1970; BEDELEANU, 1985; ENESCU, 1990; ZAESLEIN, 1982; CRISTEA-POPA și colab., 1991; VALNET, 1987; MC CORMIC, 1980; DEVLIN, 1986; LEHNINGER, 1987 etc.).

Ochii, care sunt organe specializate pentru vedere, se găsesc numai la moluște, artropode și vertebrate. Cu toate că ochii acestor organisme diferă sub aspect anatomic, ei conțin în celulele fotoreceptoare aceeași grupare prostetică (11-cis-retinal), fapt ce denotă existența unei evoluții „convergente" în regnul animal în procesul vederii.

Scanned with OKEN Scanner

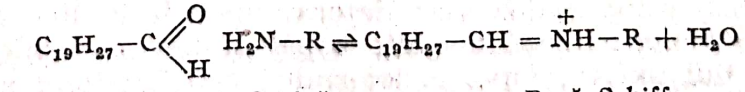
În partea posterioară a bulbului ocular la om și la vertebrate, se găsește *tunica nervoasă,* care este o porțiune periferică a *teleencefalului,* în care se desting două zone: *zona vizuală* (retina vizuală) și *zona oarbă* (retina oarbă). Retina vizuală conține în structura sa *celule senzoriale* și *nevroglii.* Celulele senzoriale sunt de două feluri; cu prelungiri în formă de *bastonașe* și cu prelungiri în formă de *conuri,* care sunt capabile să absoarbă energia luminoasă cu ajutorul carotenoproteidelor pe care le conțin. Celulele nervoase din zona vizuală sunt neuronii bipolari, neuronii multipolari și neuronii de asociație. Aceste celule sunt aranjate în retină în zece straturi succesive, dintre care penultimul strat numit și *stratul fibrelor nervoase,* este alcătuit din axonii celulelor nervoase. Fibrele nervoase formate din neuronii existenți în retină se îndreaptă spre locul de ieșire al nervului optic din globul ocular, formând *pata oarbă* sau *papila optică.*

Dintre elementele morfologice ale retinei aflate pe stratul exterior, un rol foarte important, dacă nu chiar cel mai important, în procesul vederii, îl au celulele în formă de conuri și celulele în formă de bastonașe. Ochiul omului conține aproximativ 6—8 milioane de conuri, 125 milioane de bastonașe și aproximativ un milion de fibre optice.

Celulele în formă de conuri și cele în formă de bastonașe (numite prescurtat conuri și respectiv bastonașe), conțin pigmenți fotoreceptori, capabili să absoarbă radiațiile luminoase la anumite lungimi de undă și prin modificări structurale să determine o descărcare electrică (energetică) care va contribui la formarea impulsului nervos (biocurent), ce va fi transmis prin nervul optic la creier în regiunea olfactivă, unde are loc formarea imaginii. Retina, prin intermediul carotenoproteidelor din conuri și bastonașe absoarbe energia luminoasă, selectează și remodelează stimulii prin transformarea energiei radiațiilor absorbite în impuls nervos (biocurent), înainte de a-l transmite creierului, care are funcție de integrare, de formare a imaginii complete. Retina deci nu poate fi comparată numai cu o placă fotografică, pe care se fixează imaginea obiectului privit, deoarece ea transformă energia luminoasă în impuls nervos.

În retina ochiului la om și la vertebrate se găsesc deci două tipuri de celule fotoreceptoare: *bastonașele,* implicate în vederea crepusculară și nocturnă și *conurile,* implicate în vederea diurnă și în diferențierea culorilor. În bastonașe se găsește ca pigment fotosensibil *rodopsina,* de culoare roșie, iar în conuri *iodopsina,* pigment de culoare violetă. Atât rodopsina cât și iodopsina conțin aceeași grupare prostetică — *11-cis-retinal.* Pigmenții fotoreceptori (rodopsina, iodopsina) constituie „substratul molecular al vederii ochilor".

Pigmenții fotoreceptori se deosebesc prin partea proteică, care este *opsina* pentru rodopsină și *fotopsina* pentru iodopsină. Rodopsina este o carotenoproteidă cu masa moleculară la om și bovine de 38 000—40 000 UMA. Spectral s-a stabilit că 11-cis-retinalul se leagă de opsină prin gruparea sa aldehidică, care reacționează cu gruparea $-NH_2$ terminală a lizinei din molecula obsinei, sub forma unei baze Schiff protonate:



11-cis-retinal Opsină Bază Schiff

Scanned with OKEN Scanner

Sub acțiunea fotonilor absorbiți se produce izomerizarea 11-cis-retinalului în all-trans-retinal, cu modificări conformaționale, care duc la decolorarea rodopsinei și desfacerea all-trans-retinalului de opsină.

Concomitent cu aceste transformări, energia fotonilor absorbiți determină eliminarea unor electroni cu potențial mare de energie din 15-cis-retinal, care vor forma impulsul nervos (biocurent), ce va fi transmis la creier. Din stimulii primiți de la numeroasele celule fotosenzitive, se va forma în creier imaginea obiectului privit. După ce impulsul nervos este transmis nervului optic, all-trans-retinalul se poate reizomeriza în retină în 11-cis-retinal la întuneric, cu consum de energie sub acțiunea transretinalizomerazei.

Cea mai mare parte însă a all-trans-retinalului este redusă pe cale enzimatică în all-trans-retinol, sub acțiunea retinenreductazei (care conține ca și coenzimă $NADH+H^+$), care va fi eliminat în sângele organismului. Din sânge o nouă cantitate de 11-cis-retinol se va oxida în 11-cis-retinal, sub acțiunea retinaloxidazei și va contribui la biosinteza unor noi molecule de rodopsină. În ficat, retină și sânge, all-trans-retinalul se poate izomeriza sub acțiunea cis-trans-izomerazei și a retinaldehidrogenazei (NAD^+) în 11-cis-retinal, proces ce se realizează într-o proporție redusă.

Punctul crucial în transformările din ciclul vizual îl constituie mecanismul prin care decolorarea rodopsinei inițiază impulsul nervos în retină, astfel încât imaginea luminoasă a obiectului privit ajunge să fie percepută în creier. Absorbția fotonilor de către veziculele discoide din celulele bastonașe. provoacă, pe lângă izomerizarea 11-cis-retinalului în all-trans-retinal și o modificare a conformației moleculei de rodopsină, care afectează permeabilitatea membranelor veziculelor, inclusiv diferența de potențial a acestora, astfel încât ionii de calciu ies din vezicule, declanșând și amplificând impulsul nervos. Se știe că ionii de calciu sunt mediatori sau mesageri care cuplează sistemul contractil al mușchiului cu impulsul nervos excitant (LEHNINGER, 1987).

Prin cercetări ulterioare s-a stabilit că vitamina A_1 este implicată în transportul Ca^{2+} prin anumite membrane, analog cu mecanismul din celulele bastonaș. Acest rol explică efectele carenței și al abuzului de retinol din hrană asupra sistemului osos, a dinților și a sistemului conjunctiv.

Unii cercetători consideră structura membranară a conurilor și bastonașelor ca un *complex izolator*, între cele două fețe ale membranelor (internă și externă) încărcate electric diferit (+ și —), între care se situează fotopigmentul, care prin absorbția unui foton suferă o izomerizare cis-trans, îndepărtându-se astfel impedimentul steric al legăturii 11-cis și formarea unui „orificiu“ unimolecular, care permite fluxul liber al electronilor și declanșarea unei descărcări de potențial (pilă voltaică biologică).

Alți cercetători susțin că sub influența luminii, membrana externă a bastonașelor și a conurilor s-ar hiperpolariza în aproximativ 10 milisecunde după iluminare și ar reveni rapid la nivelul inițial când lumina nu mai acționează, deci când segmentul respectiv intră în repaus. În acest proces, rolul major s-ar datora mișcării ionilor de sodiu. La întuneric membrana externă permite o pătrundere puternică de ioni de sodiu din mediul extern, fapt ce determină apariția ionilor de sodiu în

Scanned with OKEN Scanner

spațiul intramembranal, susținut printr-un sistem transportor activ, prin „pompa de Na^+ — K^+“, localizată în interiorul membranei segmentului extern. În continuare Na^+ curg (difuzează) în segmentul intern, de unde vor fi ulterior eliminați printr-o pompă dependentă de ATP. Lumina absorbită blochează canalele de pătrundere a Na^+ din exterior (în interior), fapt pentru care interiorul membranei devine negativ. Această hiperpolarizare este transmisă pasiv la corpul sinaptic. Aceste schimbări ale permeabilității și hiperpolarizării membranelor sunt răspunsuri puternic amplificate la segmentul terminal al bastonașelor. Fotocurentul format prin acest mecanism s-ar datora fotonilor absorbiți (10^5—10^6). Acest răspuns este jumătate maximal când numai 30 de fotoni sunt absorbiți de către un segment extern al bastonașelor, care conține aproximativ 40 milioane molecule de rodopsină. Rezultă că proprietățile membranelor plasmatice sunt puternic modificate (hiperpolarizate) când o singură moleculă de rodopsină dintr-un milion este excitată de un foton.

Rodopsina se va resintetiza la întuneric prin combinarea 11-cis-retinalului (care conține două duble legături conjugate în poziție cis) cu obsinina. Așa după cum s-a menționat, sub influența radiațiilor luminoase (a stimulului specific), rodopsina absoarbe fotoni și se descompune în opsină (proteină incoloră) prin intermediul lumirodopsinei de culoare roșie-portocalie și a metarodopsinei de culoare galbenă și a11-trans-retinal. Concomitent cu descompunerea rodopsinei și cu decolorarea acesteia se realizează transformarea 11-cis-retinalului în a11-trans-retinal printr-o reacție ireversibilă și se realizează totodată transformarea energiei luminoase în impuls nervos.

Transformarea stereochimică a 11-cis-retinalului în a11-trans-retinal se face cu degajare de energie, iar izomerul obținut este mai stabil și mai sărac în energie. Prin această transformare se înlătură impedimentul steric impus de legăturile cis și astfel electronii π se pot deplasa pe o anumită distanță în izomerul trans, toți în același sens, rezultând o mișcare similară cu a unui electron care s-ar deplasa „înainte și înapoi“.

Procesele fotochimice și cele biochimice care au loc în conuri sunt similare cu cele din bastonașe, cu excepția că 15-cis-retinalul se combină cu trei fotopsine diferite formând trei pigmenți vizuali distincți, sensibili la lungimi de undă roșii, verzi și albastre, cu maxime de absorbție diferite, la 435, 540 și respectiv 565 nm. Ochiul primatelor are astfel patru pigmenți vizuali — rodopsina și trei iodopsine — acoperind împreună o zonă mare din spectrul luminii.

În acest ciclu de reacții se consumă o anumită cantitate de retinol, care trebuie înlocuit din exterior. Lipsa sau insuficiența vitaminei A_1 din organism determină incapacitatea acestuia de regenerare a rodopsinei, urmată de tulburări oculare ca pierderea vederii.

Rodopsina și iodopsina absorb radiații cu lungimi de undă diferite, ceea ce explică participarea lor în procesul vederii diurne și respectiv nocturne. Moleculele acestor pigmenți fotosensibili pot fi excitate de un singur foton, care poate fi convertit în „semnale“ proprii celulelor nervoase.

Dacă o moleculă de rodopsină absoarbe un foton, se eliberează un electron, iar energia produsă se îndreaptă spre capătul opus al basto-

Scanned with OKEN Scanner

naşelor, care prin sinapse cu celulele nervoase bipolare din retină asigură transmiterea „informaţiei“ vizuale la nervul optic şi prin acesta la creier.

Bastonaşele conţin aproximativ 40—50% proteine şi 20—40% lipide. Rodopsina reprezintă 4—10% din masa bastonaşelor. Ele au aspectul unor membrane biologice, cu structuri plane, care se repetă la aproximativ 120 Å, având astfel unele asemănări structurale cu cloroplastele.

Celulele bastonaşe din retină conţin multe vezicule discoide aşezate compact, similar granelor din cloroplast, paralel cu suprafaţa fotoreceptoare a retinei. Bastonaşele sunt celule subţiri, alungite, tipice, cu lungimea de 40 μm şi diametrul de 1 μm, ce conţin în interior aproximativ 1000 de vezicule discoide aranjate perpendicular una peste alta.

Schema simplificată a procesului vederii se prezintă în figura 2.8.

În condiţiile unei alimentaţii raţionale, se realizează o funcţionare normală a ochilor şi se menţine un echilibru între formarea şi desfa-

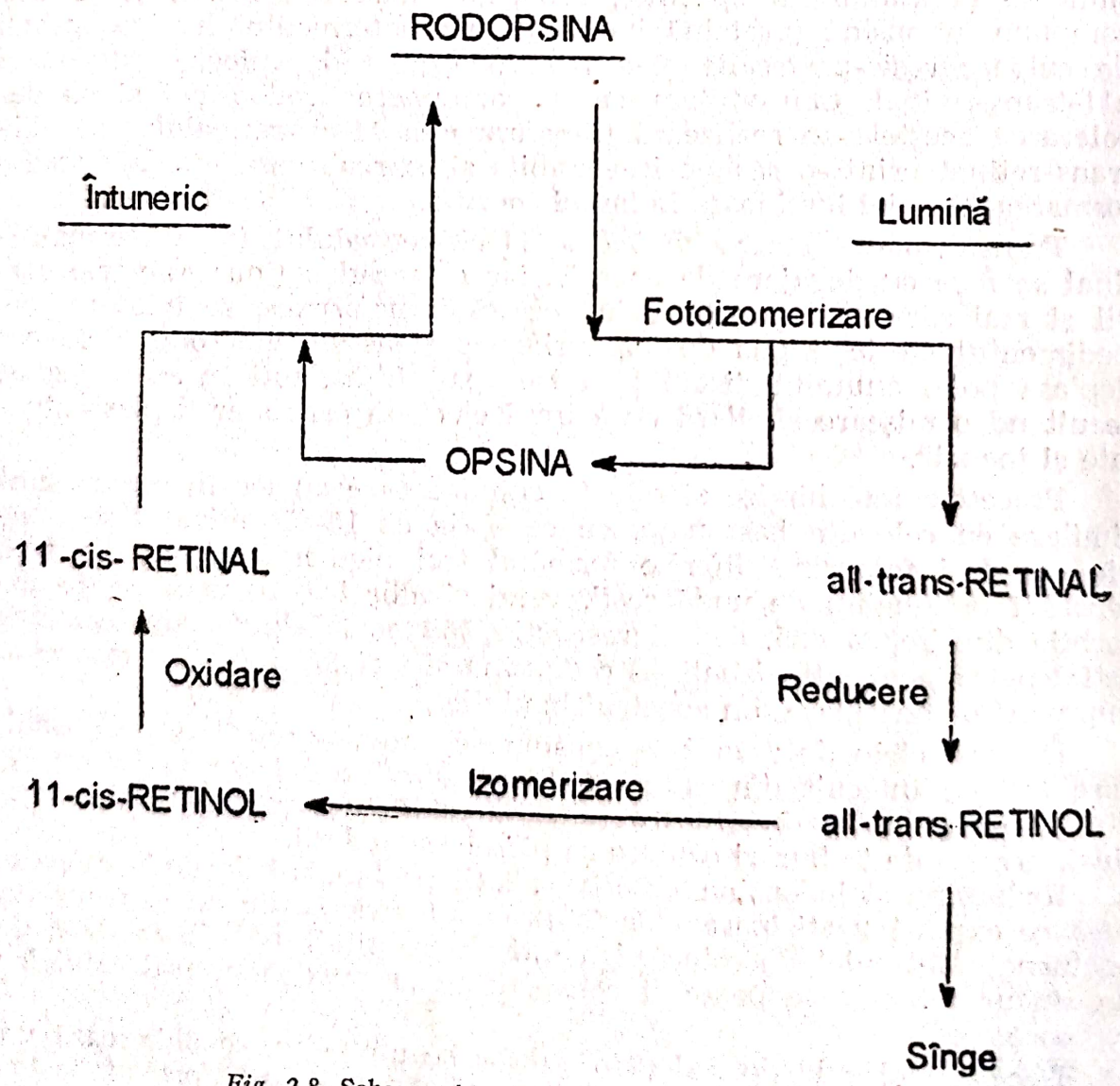


Fig. 2.8. Schema simplificată a procesului vederii

Scanned with OKEN Scanner

cerea pigmenților fotosensibili, precum și între conținutul retinalului și al retinolului din sânge și din retină.

Existența hemeralopiei, independentă de carența în retinol, în albinism, la bătrâni cu glaucom, cu cataractă, în diabet, boli hepatice, în intoxicații cu alcool sau cu mercur, plumb etc., se datorește în mare parte alterării echilibrului dintre retinal și retinol.

Vederea colorată este realizată prin trei fotoreceptori diferiți, a trei feluri de celule conice: cianopsina care are maximul de absorbție la 455 nm în zona albastră, iodopsina cu absorbție la 530 nm în zona verde a spectrului luminii și porfiriopsina cu absorbție la 625 nm în zona roșie.

Determinările spectrale arată că formele de orbire (cecitate) la culori se datoresc lipsei moleculei fotoreceptorului pentru culoarea respectivă, fiind deci determinate de lipsa unui anumit tip de opsină din conuri. Unele forme de orbire sunt cauzate de mutații recesive corelate cu sexul oamenilor. Aproximativ 1% din bărbați nu percep culoarea roșie și 2% pe cea verde.

Unele organisme inferioare, care nu posedă un sistem nervos sau receptori specializați în perceperea luminii, reacționează totuși față de diverse surse luminoase. Astfel, amoeba își deplasează sau își retrage pseudopodele în funcție de intensitatea fascicolului luminos îndreptat spre ele. Viermele *Lambricus terestris* este capabil să diferențieze culoarea galbenă și albastră datorită unor receptori situați pe toată suprafața corpului (pentru culoarea galbenă) sau pe cele două extremități (pentru culoarea albastră). *Dafnia,* care este un crustaceu foarte mic, poate diferenția trei culori: galben, albastru și violet.

11-cis-retinalul are un rol însemnat atât în formarea impulsului nervos, prin reacțiile specifice de izomerizare în a11-trans-retinal sub acțiunea luminii, cât și în stabilizarea obsinei, a culorii acesteia, precum și în preîntâmpinarea degradării celulelor fotosensibile, a conurilor și bastonașelor.

Celulele în formă de conuri determină o adaptare rapidă a ochiului la lumină, o acomodare inițială, realizând o vedere *fotocopică,* iar celulele în formă de bastonașe asigură adaptarea secundară, realizând o vedere *scotopică* (reducerea vederii la întuneric).

2.7.2. ROLUL VITAMINELOR A ÎN PROTEJAREA ȘI REFACEREA EPITELIILOR

Vitaminele A au un rol însemnat în păstrarea funcțiilor normale ale pielii, epiteliilor și mucoaselor, în protejarea și refacerea acestora. Lipsa vitaminelor A din hrană și din organism determină modificări în structura tuturor țesuturilor și organelor de origine ectodermică. Astfel, în stări de hipovitaminoză și mai rar avitaminoză la nivelul pielii se produce o hiperkeratinizare a epidermiei, cu atrofierea foliculilor piloși, a glandelor sebacee și sudoripare.

La nivelul aparatului respirator se produce o keratinizare a epiteliului laringian, cu apariția unor răgușeli de lungă durată.

La nivelul aparatului urogenital apar keratinizări la nivelul epiteliilor germinative ale testicolelor, ale mucoaselor uterine și vaginale. Prezența celulelor keratinizate în lichidul vaginal duce la un estru prelungit, denumit *kolpokeratoză.*

Scanned with OKEN Scanner

La nivelul epiteliilor gingivale apar modificări care favorizează infecțiile specifice ale paradontozelor.

La animale de laborator aflate în stări carențiale de vitamină A, se produce o modificare progresivă a epiteliilor, care se transformă în epitelii stratificate și keratinizate, neputând să-și îndeplinească normal rolul fiziologic în organism. Apar calculi renali. Datorită acțiunii de apărare a epiteliilor tisulare și a mucoaselor, a întregului ectoderm cu formațiunile sale, vitaminele A au și efect antiinfecțios.

Dintre formele active ale vitaminelor A (retinol, retinal, acid retinoic), retinolul se combină cu acidul fosforic și formează fosfatul de retinol (retinil-fosfat), care are un rol important în biosinteza unor glicoproteide și mucopolizaharide, care reglează creșterea normală a celulelor și a secrețiilor mucoase.

Atât retinolul cât și acidul retinoic se leagă în citosol de o proteină receptoare, care transportă acești compuși sub formă de complexe retinoido-proteice la nucleu, unde se leagă de cromozomi și influențează biosinteza unei proteine specifice, implicată în reglarea creșterii și diferențierii celulare. Astfel că retinolul și acidul retinoic pot fi considerați că au un rol similar hormonilor steroidici în reglarea creșterii și diferențierii celulelor (DEVLIN, 1986).

2.7.3. ROLUL VITAMINELOR A ÎN PROCESELE DE CREȘTERE ȘI REPRODUCERE

Vitaminele A au, de asemenea, un rol însemnat în creșterea și reproducerea la om și la animale. Pe baza mai multor experiențe s-a remarcat că la animalele de laborator, aflate în stări carențiale, apar anomalii congenitale la urmași. Scade în mod accentuat fertilitatea animalelor și se produce o degenerare a organelor de reproducere. Din datele prezentate anterior reiese în mod clar rolul important al vitaminelor A în menținerea sănătății țesuturilor epiteliale. Acum se știe că retinolul și acidul retinoic împiedică biosinteza keratinei și procesul de keratinizare a celulelor, iar fosfatul de retinol este necesar pentru stimularea biosintezei glicoproteidelor și a mucopolizaharidelor, componente importante ale mucoaselor secretate de celulele epiteliale. In lipsa acestor secreții mucoase, celulele epiteliale încep să se usuce și începe procesul de keratinizare a epiteliilor. Se micșorează simțitor rezistența țesuturilor epiteliale la infecții la nivelul aparatului respirator, gastrointestinal și urogenital. Se produc fisuri în membranele celulelor epiteliale prin care pătrund ușor microorganisme patogene.

Vitaminele A intervin și în procesele de creștere a oaselor. În carența de vitamine A se produce atât la om cât și la animale, o diminuare accentuată a diviziunii celulelor în cartilagiile de conjugare și o atrofiere a celulelor formate. Oasele compacte se îngroașă și produc compresiuni pe creier sau la măduva spinării. După unii autori, vitaminele A sunt necesare și pentru formarea smaltului dinților și a dentinei. Ele stimulează biosinteza hormonilor corticosteroizi, a hormonilor corticosuprarenali și a celor sexuali. În stări de avitaminoză A este tulburată activitatea sistemului hematopoietic. În ficat și splină se depozitează cantități mari de homosiderină, necesară biosintezei globulelor roșii. Pentru contribuția vitaminelor A în procesele de creștere a animalelor, ele se mai numesc factor de creștere, cu toate că în acest

Scanned with OKEN Scanner

proces acțiunea lor este cuplată și cu a altor factori (vitaminele din complexul B, vitamina C, hormoni etc.), fapt care uneori este dificil de stabilit aportul efectiv și specific al vitaminelor A în procesele de creștere și reproducere.

În carența vitaminelor A se produce la femei keratinizarea celulelor vaginale, tulburări ale ciclului menstrual, iar la bărbați atrofierea tubilor seminiferi cu scăderea spermatogenezei, fenomene ce duc la scăderea simțitoare a capacității de reproducere, cu apariția sterilității la ambele sexe.

2.7.4. HIPOVITAMINOZE ȘI HIPERVITAMINOZE A

La om, carența în vitaminele A se manifestă clinic prin apariția hemeralopiei, xeroftalmiei și keratomalaciei.

Hemeralopia sau orbul găinilor apare printre primele semne ale stării de hipovitaminoză A și se caracterizează prin faptul că bolnavii practic nu mai sunt capabili să se orienteze după căderea întunericului și văd foarte greu la lumină crepusculară. Această boală este dificil de identificat în stările incipiente de avitaminoză și poate fi ușor vindecată printr-o alimentație bogată în vitamina A_1 și carotenoide provitaminice administrată bolnavilor.

Xeroftalmia apare într-o stare mai îndelungată și mai avansată de avitaminoză A, iar în final apare orbirea. Xeroftalmia începe prin modificări degenerative la nivelul ochiului, încetarea secreției glandelor lacrimare, sebacee și sudoripare, uscarea conjunctivitei, mai accentuat la unghiurile ochilor, albul ochiului devine tulbure, corneea se stratifică și devine rugoasă, apar infecții oculare și în cele din urmă survine orbirea. Apar de asemenea infecții gingivale.

Keratomalacia se caracterizează prin înmuierea corneei concomitent cu atrofierea sa. Această afecțiune apare într-o stare avansată a avitaminozei A și progresează rapid, determinând o regresie a globului ocular. Dintre semnele clinice cele mai evidente ale keratomalaciei menționăm dezintegrarea necrotică și sclerozarea corneei.

In stări de avitaminoză se produce o modificare a echilibrului mineral în sânge, producându-se o scădere a conținutului elementelor minerale: P, Ca, Mg, K, scad globulele roșii (deci și hemoglobina), globulele albe și trombocitele, scad bazele purinice necesare biosintezei acizilor nucleici.

Unele manifestări clinice care apar în stări carențiale de vitamine A cum sunt leziunile cutanante, hiperkeratoza foliculară, afecțiuni ale epiteliilor aparatului respirator și urogenital etc., nu întotdeauna se datoresc lipsei vitaminelor A ci stărilor carențiale în complexul vitaminic B, hipovitaminoza C, dereglări hormonale etc.

Avitaminoza A secundară apare frecvent datorită dereglărilor în ce privește absorbția, transportul și convertirea carotenoidelor în vitamine A. Lipsa sau insuficiența grăsimilor și a sărurilor biliare din intestin, disfuncționalități ale epiteliilor intestinale, a afecțiunilor care împiedică depozitarea vitaminelor și transformarea carotenoidelor în vitamine etc.

Hipovitaminoza A apare foarte rar la animalele ierbivore, numai în cazuri de boli intestinale, hepatice sau dacă primesc hrană uscată,

Scanned with OKEN Scanner

săracă în carotenoide, o perioadă îndelungată. Furajele însilozate și cele uscate au un conținut mult mai redus de carotenoide decât iarba sau furajele proaspete, care asigură conținutul de provitamine A necesar animalelor. Cu toate că animalele ierbivore consumă vara cantități mari de iarbă și de furaje proaspete, cu cantități mari de carotenoide provitaminice, în exces față de necesități, ele nu suferă de hipervitaminoză, datorită probabil mecanismelor care inhibă transformarea acestora în retinol. Necesarul zilnic de ß-caroten pentru bovine nu trebuie să fie mai mare de 70 µg/korp (BUTLER și colab., 1973).

Hipervitaminoza A apare în urma unui consum exagerat de alimente bogate în vitamine A sau în carotenoide provitaminice. În hipervitaminoză apar simptome clinice oarecum asemănătoare hipovitaminozei A. La eschimoși, care consumă cantități mari de ficat de urs alb, bogat în vitamina A_1 (50 000 UI/g) și mult pește, apar intoxicații care se manifestă prin vărsături, cefalee, somnolență, amețeli, precum și descuamarea pielii în jurul gurii, fisuri labiale etc. La copii în stări de hipervitaminoze apar intoxicații cronice, prurit anal, cefalee, dureri articulare, insomnie, rărirea părului pe cap, transpirații nocturne etc. Suplimentarea exagerată cu retinol a alimentelor în timpul gravidității la femei, determină în multe cazuri nașterea copiilor cu malformații. La unele persoane hipervitaminoza A determină tumefacții subcutanate, hiperpigmentație, hipertensiune intracraniană, hipercalcemie etc.

La șobolani, hipervitaminoza A provocată, determină o creștere a lipidelor în ficat, intestin, creier și o scădere a acestora în rinichi. Crește de asemenea nivelul colesterolului din sânge. Hipervitaminoza A la om nu poate fi indusă nici când se administrează zilnic 100 mg β-caroten, timp de 6—12 luni. Singurul semn clinic ce apare în această perioadă, „icterul carotenic", se caracterizează printr-o colorare galben-portocalie neuniformă a pielii, fără să apară cazuri de intoxicare. Dacă însă se administrează la șobolan o singură doză orală de 1 600 000 UI de retinol, pot apare convulsii care să determine moartea organismului în câteva ore. Pentru a înlătura starea de hipervitaminoză este necesar să scadă conținutul vitaminelor și al provitaminelor din hrană până la 5 000 UI/kg corp, timp de 200 de zile.

Cantități mari de retinol produc la animale fenomene de intoxicare, care se manifestă prin scăderea în greutate, decalcifieri osoase masive, blana își pierde luciul, părul începe să cadă, apar edeme în jurul ochilor și pleoapelor etc. Apar de asemenea hemoragii intestinale, crește conținutul lipidelor în ficat și al colesterolului în sânge. Doze mari de vitamine A pot determina reacții negative (adverse). Astfel, la nivelul sistemului nervos central apar cefalee, delir, la nivelul ochilor nevrită optică cu edem papilar, la nivelul pielii xerodermie, caracterizată prin keratinizarea dermei și a glandelor existente.

2.7.5. CORELAȚIA ACTIVITĂȚII VITAMINELOR A CU A ALTOR COMPUȘI

În ce privește corelația vitaminelor A cu lipidele se remarcă că în stări de avitaminoză A apare în sânge hiperlipemie și hipercolesterolemie. Vitaminele A au un rol activ în oxidarea acizilor grași, în biosinteza gliceridelor, a fosfolipidelor, colesterolului și a hormonilor steroizi.

Scanned with OKEN Scanner

Prezența în alimente a unor cantități mari de monoglucide, oligoglucide și chiar poliglucide determină o scădere accentuată a conținutului vitaminelor A din ficat, dar nu și din sânge.

Vitaminele A stimulează biosinteza bazelor purinice, a acizilor nucleici și implicit a proteinelor. Ele au un rol esențial în biosinteza mucopoliglucidelor. La unele persoane, stările anemice care apar frecvent în avitaminoze A, se datoresc imobilizării fierului depus în ficat. Studii recente au demonstrat că retinolul și acidul retinoic sunt necesari pentru biosinteza unor transferine care realizează transportul fierului în sânge.

Vitaminele A și E manifestă în procesele biologice o acțiune sinergică. Ambele vitamine au un caracter antioxidant însemnat. Vitamina E stimulează resorbția intestinală a vitaminelor A, protejându-le de procese oxidative. Scăderea treptată a conținutului vitaminelor A din ficat și sânge este însoțită de o creștere progresivă a vitaminelor E în sânge și a ubichinonei în testicole și ficat. La șobolan se înregistrează un paralelism între conținutul vitaminelor A și C din sânge. Administrarea de vitamine A în hrana oamenilor determină o întârziere în apariția scorbutului, dar cantități mari de vitamina A_1 (200 000 UI), determină o creștere a eliminării vitaminei C prin urină.

Vitaminele A au interrelații biochimice și cu numeroși hormoni. În stări carențiale ale vitaminelor A se produce o scădere a funcționării hipofizei, în special a formării hormonilor steroidici. Vitaminele A contribuie împreună cu hormonii hipofizari și cu cei tiroidieni la reglarea metabolismului bazal. Aproximativ 2,5 μg de β-caroten, „echilibrează" acțiunea a 50 μg de tiroxină.

În hipofuncția tiroidei crește conținutul carotenoidelor din sânge datorită diminuării biosintezei carotenogenezei.

Vitaminele A influențează favorabil formarea legăturilor chimice dintre proteine și lipide influențând astfel integritatea și funcționalitatea membranelor celulare, a permeabilității acestora. Un conținut ridicat de vitamine A în sânge și în celule, determină o creștere a permeabilității membranelor lizozomiale. În carență de vitamine A se remarcă o diminuare a proceselor de sulfoconjugare a fenolilor și o eliminare crescută a sulfaților anorganici. În stările hipovitaminice A apar infecții spontane și stări febrile, diferite stări patologice, fapt pentru care vitamina A_1 se mai numește și „vitamină antiinfecțioasă".

Pe baza cercetărilor experimentale și a celor clinice, s-a stabilit că în stări de hipovitaminoză A îndelungată sau în avitaminoză, apar ca manifestări evidente slăbirea rezistenței organismului la infecții și la acțiunea substanțelor toxice, tulburări la nivelul ochiului, pielii, aparatelor urogenital, digestiv și respirator, ale glandelor endocrine și ale metabolismului intermediar, fapt ce relevă acțiunile multiple și complexe ale vitaminelor A în procesele biologice în organismele sănătoase și în cele cu diferite afecțiuni.

2.7.6. VITAMINELE A ȘI MALIGNITATEA

Carotenoidele și vitaminele A îndeplinesc în celule și țesuturi un rol antioxidant pronunțat. La o tensiune joasă a oxigenului existentă în organism, acești compuși reduc riscul apariției bolilor de cancer

Scanned with OKEN Scanner

inițiate de radicali sau de alți oxidanți puternici. Un tratament profilactic adecvat cu vitamine A sau cu carotenoide provitaminice reduce riscul apariției cancerului la plămâni, mai ales la fumători.

Numeroși cercetători (MATHEWS-ROTH, 1980; ROGERS și colab., 1973; LOTAL și colab., 1980 etc.), pe baza unor rezultate clinice și de laborator, susțin că tratamentul cu retinoide este extrem de eficient în perioada de preneoplazie a celulelor. Pe cale experimentală s-a demonstrat pe culturi de celule *in vitro,* că în lipsa retinoidelor din mediul de cultură nu se produce o creștere și o diferențiare a celulelor din țesuturile epiteliale, iar la celulele din țesuturile traheale, bronhice și prostatice apar leziuni premaligne. Prin adăugarea de retinoide în aceste culturi de celule malignizate, se produce inversarea procesului de keratinizare și refacerea celulelor ciliate ale mucoaselor. Unii autori (NETESHEIM și colab., 1975) susțin că se pot trata cu eficiență sporită în faza preneoplazică, acele tipuri de cancer care au o perioadă latentă de evoluție lungă de 20—25 de ani. L.R. LOTAL și colab (1980) au raportat că experimental au reușit, prin tratament cu retinoide naturale, să inverseze procesul de malignizare în stomac, vagin și uter. Un studiu epidemiologic, efectuat pe 8000 de persoane în Norvegia a arătat că scăderea conținutului retinolului din hrană este corelată cu creșterea cancerului pulmonar, în vezică și în colon, procesul fiind mai accentuat la oamenii fumători. Întrucât retinoidele naturale când sunt administrate în cantități mari sunt toxice, s-au făcut experimentări cu retinoide sintetice (acidul 13-cis-retinoic, esterul etilic al acidului retinoic, acetilamina retinoică, retinil-N-acetil-amina etc.), care s-au dovedit a fi mai active și mai puțin toxice. S-a stabilit de asemenea pe cale experimentală că pigmenții carotenoidici au activitate antitumorală în cazul tumorilor provocate de lumina ultravioletă. R.C. MOOR în lucrarea „Aspecte comparative ale carotenoidelor și retinoidelor ca agenți chemopreventivi pentru cancer“ (1984), arată că pe baza a numeroase date experimentale cu diferite tipuri de cancer, se poate afirma cu certitudine că retinoidele sunt compuși anticanceroși care înhibă apariția cancerului la diferite organe și țesuturi, inclusiv la nivelul glandelor mamare, vezicii urinare, plămâni, piele, ficat, pancreas, colon, esofag etc. Modificările structurale care se produc în molecula retinoidelor determină formarea unor izomeri, a unor compuși analogi structurali, care au o activitate inhibitoare mai mare și acțiune toxică mai redusă decât compușii inițiali. Dintre compușii retinoidici sintetici, N(4-hidroxifenil)-retinamida (4-HPR) s-a dovedit a fi cel mai eficient compus chemopreventiv în cancerul indus la sâni, vezica urinară și plămâni la rozătoare. Retinoidele au un efect sporit în vindecarea cancerului dacă se administrează la scurt timp după apariția acestei maladii și mai cu seamă în tratamentele profilactice. Activitatea chemopreventivă a retinoidelor în afecțiunile cancerigene crește simțitor dacă tratamentele cu retinoide se fac împreună cu compuși care stimulează creșterea și diferențierea celulelor (hormoni, vitamine). Numeroase cercetări epidemiologice efectuate în diferite țări au stabilit o relație inversă clară între consumul alimentelor cu conținut ridicat în vitamine A și apariția bolilor neoplazice, așa încât caracterul chemopreventiv al retinoidelor nu mai poate fi privit cu neîncredere. Totodată s-a stabilit că nu toți compușii retinoidici au o eficiență egală în inhibarea cancerului indus în țesuturile epiteliale. De asemenea s-a

Scanned with OKEN Scanner

stabilit că în stări de hipo- sau avitaminoză A un timp mai îndelungat, crește riscul apariției cancerului la plămâni, în cavitatea bucală și vezica urinară, în timp ce administrarea retinoidelor în doze farmacologice inhibă carcinogeneza.

La un consum ridicat de produse vegetale bogate în carotenoide provitaminice scade simțitor riscul apariției cancerului la prostată, dar nu și la stomac. De asemenea s-a observat că acidul 13-cis-retinoic este foarte activ și eficient în inhibarea cancerului indus experimental în sânge, dar are un foarte slab efect asupra carcinogenezei mamare. Există deci diferențieri semnificative în ce privește acțiunea retinoidelor în afecțiunile canceroase ale diferitelor organe și țesuturi, precum și grupe de populații, în funcție de regimul alimentar. Administrarea cronică a vitaminelor A și a derivatelor acestora trebuie limitată datorită caracterului toxic al acestora, prin creșterea concentrației lor în organism. Tratamentele cu retinoide trebuiesc stabilite în clinici oncologice, de persoane specializate în asemenea tratamente, pe perioade limitate și control periodic. Persoanele care au o alimentație echilibrată în substanțe nutritive, suplimentarea rației cu carotenoide și vitamine A nu este corelată cu creșterea retinoidelor în sânge, probabil datorită unor mecanisme care reglează conținutul acestora în sânge.

În ce privește mecanismul de acțiune a retinoidelor se presupune că acestea s-ar combina cu unele proteine citoplasmatice transportatoare formând un complex retinoido-proteic activ, care ajunge în nucleu și modifică informația genetică din mARN, formându-se proteine mutante care au capacitatea de a suprima expresia fenotipului neoplazic local, menținând celula într-o formă diferențiată. Experimental s-a pus în evidență prezența proteinei citoplasmatice care transportă retinolul în citoplasma celulelor neoplazice și absența acestei proteine în țesuturile refractare la retinoide (ROGERS și colab., 1973), fapt ce ar confirma mecanismul de acțiune menționat. Alți cercetători LOTAL și colab., 1980), susțin că retionidele acționează prin simularea biosintezei și a transportului glicoproteidelor și astfel mențin procesele de biosinteză din celule în stare normală.

Pe baza a numeroase cercetări s-a stabilit cu certitudine că retinoidele au capacitatea de a preveni și inhiba procesul de carcinogeneză indus prin iradiere, sub acțiunea unor substanțe chimice, sau sub acțiunea unor virusuri oncogene. Retinoidele ameliorează leziunile preneoplazice, previn carcinogeneza chimică și reechilibrează potențialul oxidoreducător din celule, inhibând totodată activitatea crescută a tirozinazei, care transformă celulele normale în melanom (ENESCU. 1990).

În ultimul timp tot mai mulți cercetători susțin că retinoidele ar afecta expresia genetică implicată atât în proliferarea cât și în diferențierea mai multor tipuri de celule normale sau neoplazice.

Acetatul de retinol este incompatibil cu substanțele oxidante, cu uleiurile râncede, guma arabică (bogată în peroxizi) etc. Retinoidele sunt mai ales bine resorbite în celule dacă sunt solubilizate cu substanțe tensioactive, care măresc permeabilitatea membranelor, favorizând astfel absorbția. În tratamentele cu retinoide nu trebuie să se administreze doze mari în stări hipertensive și la bolnavii cu glaucom.

Scanned with OKEN Scanner

La baza acțiunii carotenoidelor provitaminice și a retinoidelor în prevenirea și tratarea unor afecțiuni neoplazice la nivelul pielii și a țesuturilor epitelice, un rol însemnat revine caracterului antioxidant al acestora și de anihilare a acțiunii formelor reactive de oxigen, a peroxizilor și a altor substanțe puternice oxidante (OLSON, 1993).

În prezent se efectuează cercetări intense și se realizează progrese în ce privește sinteza unor retinoide cu acțiune anticancerigenă ridicată și cu toxicitate redusă, precum și progrese în domeniul cunoașterii mecanismelor de acțiune a vitaminelor A și a derivațiilor acestora în afecțiunile neoplazice. Aceste progrese vor aduce noi contribuții privind utilizarea farmacologică a retinoidelor în prevenirea și tratarea cancerului în faze incipiente, oprirea proceselor neoplazice în celule și revenirea acestor celule la starea normală, sub controlul sistemului nervos și a celui hormonal. De asemenea se așteaptă o mai bună clarificare a rolului ce-l pot îndeplini carotenoidele în prevenirea și tratarea bolilor canceroase, atât prin acțiunea moleculară directă a acestora, cât și prin intermediul derivaților carotenoidici.

2.7.7. ANTIVITAMINELE A

S-au pus în evidență mai multe substanțe care frânează sau inhibă activitatea vitaminelor A, dar încă nu sunt folosite în terapie. Dintre antivitaminele mai bine cercetate este citratul, care administrat la animale provoacă keratomalacie, însoțită de degradarea structurii celulelor senzoriale retiniene, a conurilor și bastonașelor. De asemenea, s-a identificat un derivat dihidroxilat al retinalului, cu caracter antivitaminic și activitate toxică (figura 2.9).

Consumul de substanțe antivitaminice determină apariția unor dereglări metabolice caracteristice avitaminozelor A. Prin administrarea unor cantități mai mari de vitamine A sau de carotenoide provitaminice se pot înlătura efectele antivitaminelor.

Activitatea biochimică a vitaminelor A este determinată de integritatea structurii lor moleculare. Modificările structurale care apar în molecula acestor vitamine determină o scădere și chiar o diminuare a activității lor biologice, iar unii compuși devin chiar antivitamine. Hidroxilarea unor duble legături din catena laterală determină formarea unor compuși cu acțiune antivitaminică A.

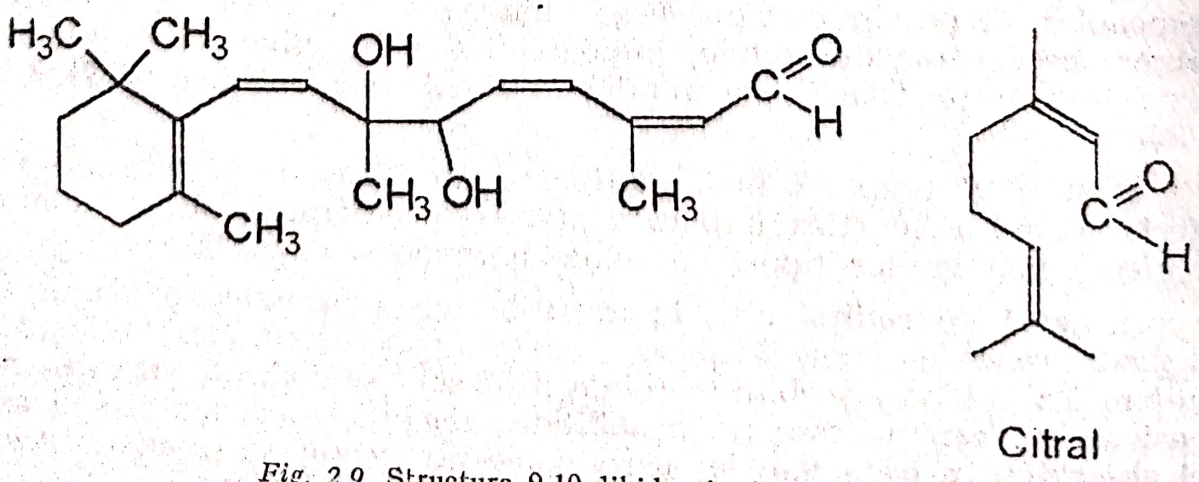


Fig. 2.9. Structura 9,10-dihidroxi-retinalului

Scanned with OKEN Scanner

Capitolul 3. VITAMINE D

3.1. Scurt istoric 64
3.2. Vitamine şi provitamine D 66
3.3. Transformarea provitaminelor D în vitamine D 70
3.4. Proprietăţi fizice şi chimice generale ale vitaminelor şi provitaminelor D 76
3.5. Metode de identificare şi dozare 77
3.6. Surse de vitamine D şi necesităţile organismului uman 79
3.7. Resorbţia şi transportul vitaminelor D 83
3.8. Rol, activitate biologică, hipo- şi hipervitaminoze D 85
3.8.1. Rolul vitaminelor D în procese metabolice 85
3.8.2. Hipovitaminoze şi hipervitaminoze 87
3.9. Interrelaţiile vitaminelor D cu alte vitamine, hormoni şi ţesuturi 92
3.10. Reprezentanţi ai vitaminelor D 93

Vitaminele D fac parte din clasa vitaminelor liposolubile, fiind cunoscute şi sub denumirea de vitamine antirahitice. Se găsesc în natură atât în stare liberă, cât şi sub formă de provitamine (steroli), care se transformă în vitamine sub acţiunea radiaţiilor luminoase. Transformarea sterolilor în vitamine D nu se face printr-o simplă scindare oxidativă, ca şi în cazul vitaminelor A, ci printr-o modificare structurală profundă a moleculelor acestora.

Se cunosc şase vitamine D diferite, notate cu litera D având indice numeric de la 2 la 7, în partea dreaptă şi de jos a literei (D_2, D_3 etc.). Toate vitaminele D au o structură chimică şi o acţiune biochimică analoagă. Rolul specific al acestor vitamine îl constituie prevenirea şi vindecarea rahitismului, reglarea metabolismului calciului şi a fosforului, stimularea absorbţiei intestinale a calciului, formarea şi funcţionarea sistemului osos. Corpul uman conţine peste un kilogram de calciu, majoritatea depozitat în oase. Unele procese fiziologice din corp sunt dependente de calciu, cum sunt coagularea sângelui, activitatea musculară, transmiterea impulsului nervos la muşchi, permeabilitatea membranelor celulare etc. Organismele animale nu pot funcţiona normal fără calciu sau fără vitaminele D, care sunt esenţiale pentru absorbţia calciului. În stări carenţiale ale vitaminei D este drastic diminuată absorbţia calciului, fapt ce va determina decalcificarea oaselor şi apariţia unor afecţiuni metabolice.

Scanned with OKEN Scanner

Din punct de vedere chimic vitaminele sunt derivați de steroli. La om și la animale vitaminele D sunt formate din sterolii provitaminici în piele, sub acțiunea luminii, în special a radiațiilor ultraviolete. O parte din vitaminele D sunt preluate de om și animale în stare liberă direct din hrană (ȘERBAN și colab., 1981). Un conținut ridicat în vitamine D au uleiul din ficatul de pește, untura de pește, gălbenușul ouălor, ficatul mamiferelor, drojdiile, pâinea, animalele marine etc. Necesarul zilnic pentru un om adult este de 400UI.

Termenul de vitamină D trebuie înțeles generic, pentru întreaga grupă a vitaminelor D.

3.1. SCURT ISTORIC

Descoperirea vitaminei D este corelată cu vindecarea rahitismului boală frecvent întâlnită la copii în secolele anterioare. Această maladie cronică se manifestă prin neîntărirea oaselor la copii, datorită perturbării depunerii sărurilor de calciu în sistemul osos în creștere. Rahitismul se mai numea și „boala englezească", deoarece apărea frecvent la copii din Anglia și în țările cu ierni lungi și o slabă luminozitate solară, precum și la copii subnutriți din marile orașe ale Europei.

Rahitismul a fost descris pentru prima dată de F. GLISSON în 1650, fiind atribuit unor cauze alimentare. Această afecțiune se manifestă la început printr-o excitabilitate crescută a organismului, însoțită de o stare psihică agitată și de transpirații excesive. Apoi boala afectează scheletul membrelor inferioare și superioare, neosificarea cutiei craniene, hipotonie musculară etc. Această boală nu este specifică omului, fiind pusă în evidență prin simptome similare și la păsări, suine, ovine și mai rar la bovine. La animale, rahitismul s-a remarcat mai frecvent la exemplarele ținute mult timp la întuneric, neexpuse la lumina solară.

Studii mai sistematice a rahitismului au început în secolele XVIII, XIX și la începutul secolului XX. *Hopkins* a demonstrat în 1906, iar mai târziu, *Mc Collum* și *Mellamby* au confirmat în 1919 că rahitismul apare în urma unei nutriții necorespunzătoare, fiind asemănător cu boala beri-beri și cu scorbutul (ENESCU, 1990).

În 1917 *Mellamby* reușește vindecarea rahitismului experimental la câini, prin hrănirea acestora cu ulei de pește. În 1919, *K. Huldsinschi,* medic de copii în Berlin, reușește să vindece copiii bolnavi de rahitism prin expunerea lor la soare și iradiere cu raze ultraviolete. In această perioadă începe să se contureze ideea că rahitismul s-ar datora lipsei unor principii alimentare și neexpunerii copiilor la soare.

H. Steenbock și *C. Funk* au arătat în 1924 că prin iradierea unor alimente (carne, ulei, slănină, pâine etc.) cu raze ultraviolete, acestea își măresc activitatea antirahitică, deși conținutul în vitamină A rămâne constant. În perioada anilor 1917—1922 vindecarea rahitismului cu untură de pește se atribuia vitaminei A, prezentă în uleiul de pește. Ulterior s-a demonstrat că alimentele bogate în vitamina A și provitamine A (lapte, fructe și legume proaspete etc.) nu posedă proprietăți antirahitice.

Scanned with OKEN Scanner

Prin cercetări ulterioare efectuate de *H. Stenbock, Mc Collum, N. Simmonds* s-a stabilit că principiul antirahitic din untura de pește este diferit de vitamina A (factorul A) și i s-a atribuit numele de *vitamina D.*

În perioada 1924—1925, mai mulți cercetători *(Hess, Weinstock, Steenbock, Black* etc.), independent unii de alții, au constatat că unele alimente de origine animală și vegetală, fără acțiune antirahitică, devin active prin iradiere cu raze ultraviolete. Tot atunci s-a ajuns la concluzia că în untura de pește se află în stare liberă atât vitamina A cât și vitamina D, iar factorul antirahitic se găsește în partea insaponificabilă a grăsimilor alimentare.

În 1925, *A. F. Hess* a stabilit că alimentele care conțin steroli, după iradiere cu raze ultraviolete, au proprietăți antirahitice accentuate, iar steridele și sterolii după iradiere își schimbă maximele de absorbție. De aici s-a tras concluzia că în alimente și în piele se găsesc unele substanțe, numite ulterior provitamine D, care sub acțiunea luminii se transformă în vitamine D.

A. Windaus a stabilit în 1926, că sterolul pur supus iradierii nu prezintă activitate antirahitică, în schimb cel impurificat existent în grăsimi are o bandă de absorbție la 280 nm și prezintă activitate antirahitică accentuată. Colesterolul pur are benzi de absorbție sub 280 nm. Cercetându-se sterolii cunoscuți în acea perioadă s-a constatat că numai ergosterolul are un maxim de absorbție la 280 nm, ceea ce i-a determinat pe cercetători să tragă concluzia că ergosterolul este provitamină D. Ergosterolul însoțește frecvent în grăsimi colesterolul, iar sub acțiunea radiațiilor ultraviolete, cu asborbție maximă la 280 nm, se transformă într-un compus ($C_{28}H_{43}OH$), care în doze mici are efecte antirahitice. Ergosterolul se găsește în cantități mari în drojdia de bere, cornul de secară, ciuperci parazite etc. Prin iradierea ergosterolului cu raze ultraviolete și apoi administrat la șobolani și la puii de găină cu rahitism experimental, s-a remarcat că ergosterolul iradiat este mai activ la șobolani decât la pui, spre deosebire de untura de pește care este la fel de activă la ambele specii. Aceste rezultate i-au determinat pe autori să aprecieze că în untura de pește și în alte alimente există mai mulți compuși cu acțiune vitaminică D, iar ergosterolului i s-a atribuit denumirea de *provitamină D* specifică.

O. Rosenheim raportează în 1927 că provitaminele D sunt steroli tetraciclici inactivi, care sub acțiunea fotochimică a radiațiilor UV se transformă în vitamine D și secosteroli cu structură triciclică prin ruperea nucleului II din grupul pentanoperhidrofenantrenic. În 1930, *Webster* și *Asken* obțin din produșii rezultați prin iradierea ergosterolului cu radiații UV, un produs cristalin, cu un puternic efect antirahitic, numit *calciferol.* În 1931, *A. Windaus* cu colaboratorii săi au izolat din alimente o substanță cristalină, cu activitate antirahitică, pe care au numit-o *vitamina* D_1. Ulterior s-a stabilit că vitamina D_1 este probabil un amestec echimolecular al vitaminei D_2 cu lumisterolul.

În 1932, *A. Windaus,* a elaborat o schemă a biosintezei vitaminei D_2 prin iradierea ergosterolului cu radiații UV, identificând ca produși intermediari bernisterolul și tahisterolul, care prin iradiere suplimentară formează suprasteroli.

Scanned with OKEN Scanner

Ulterior s-a demonstrat că 7-dehidrocolesterolul, obținut din colesterol prin dehidrogenare, supus iradierii, formează un compus principal cu acțiune antirahitică similară calciferolului, precum și unii compuși inactivi. Compusul vitaminic obținut din 7-dehidrocolesterol se numește *vitamina* D_3 sau colecalciferol, care ulterior s-a izolat în stare cristalină din ficatul unor specii de pești albaștri (ENESCU, 1990).

Din steroli provitaminici prin iradiere cu radiații UV s-au obținut și alte vitamine D, dintre care cele mai importante sunt vitaminele D_2 și D_3, iar cu activitate antirahitică mai redusă sunt vitaminele D_4—D_7. Recent s-a pus în evidență activarea suplimentară a vitaminelor D prin hidroxilări la nivelul catenei laterale și a inelului ciclic A.

3.2. VITAMINE ȘI PROVITAMINE D

Vitaminele D sunt substanțe organice care derivă de la steroli. Ele se găsesc în natură (alimente, plante, animale, microorganisme), atât în stare liberă, cât mai ales sub formă de provitamine (steroli).

Sterolii sunt monoalcooli ciclici care derivă de la hidrocarbura de bază numită steran ($C_{17}H_{28}$), ce are trei hexacicluri așezate sub formă fenantrenică și un pentaciclu atașat de inelul C, formând structura pentanoperhidrofenantrenică (fig. 3.1). Inelele se notează cu literele A, B, C și D, iar numerotarea atomilor de carbon începe din partea superioară a inelului A.

Sterolii, pe lângă structura pentanoperhidrofenantrenică conțin în molecula lor următoarele elemente constitutive:

— Ca C-3 au o grupare hidroxilică, care le conferă caracterul de alcooli secundari;
— la C-17 au fixată o catenă laterală, formată din 8—10 atomi de carbon, care se termină printr-un radical izopropilic;
— la punctele de legătură dintre cicluri, respectiv la atomii de carbon C-10 și C-13, sunt fixați metili angulari, notați cu C-18 și respectiv C-19;
— ciclurile și catena laterală pot fi complet saturate sau pot conține 1—3 duble legături.

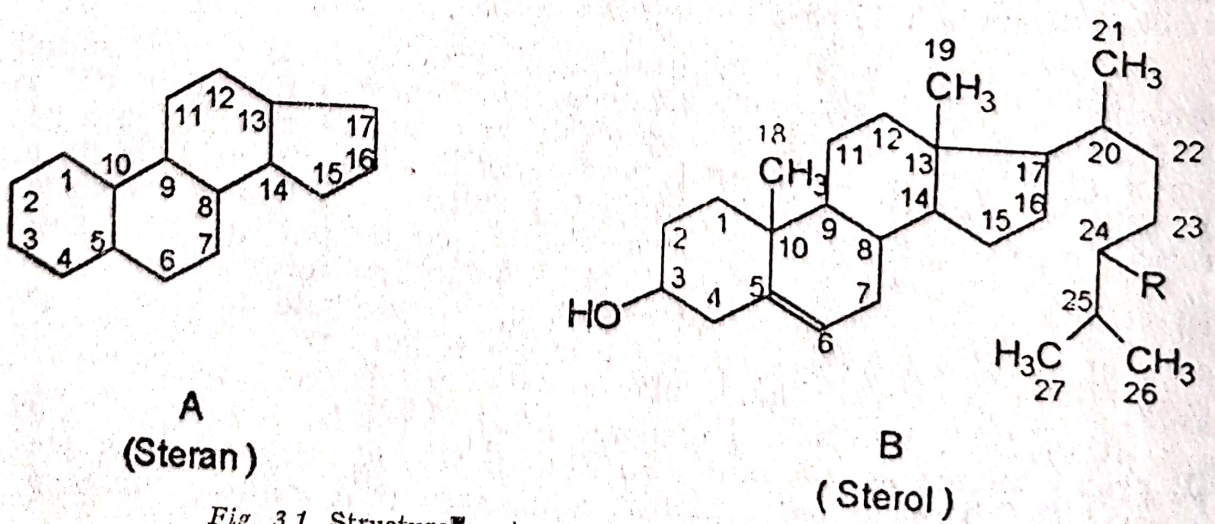


Fig. 3.1. Structura pentanoperhidrofenantrenică a sterolilor

Diferiții steroli se deosebesc între ei prin numărul și poziția dublelor legături din molecula lor, prin numărul atomilor de carbon din catena laterală și prin poziția și orientarea hidroxilului de la C-3 și a hidrogenului de la C-5.

Pentru ca un sterol să poată forma vitamine D, trebuie să conțină în inelul B, două duble legături conjugate și să aibă hidroxilul de la C-3 liber, neesterificat.

Vitamina D_2 provine de la *ergosterol,* vitamina D_3 de la *7-dehidrocolesterol,* vitamina D_4 de la *22-dihidroergosterol,* vitamina D_5 de la *7-dehidrositosterol,* vitamina D_6 de la *7-dehidrostigmasterol.* Vitamina D_1 nu s-a identificat fiind considerată de unii cercetători a fi un amestec echimolecular între vitamina D_2 și lumisterol. Vitamina D_7 provine din *7-dehidrocampesterol.* Ea este o dihidrocetonă, care are o structură moleculară analoagă vitaminei D_3. Deoarece vitamina D_7 are o bandă de absorbție caracteristică la 250 nm, se mai numește și cetona „250_3", indicele 3 arătând asemănarea structurală cu vitamina D_3. Vitamina D_7 s-a extras din unele plante și din uleiul de pește.

Dehidrogenarea sterolilor cu formare de 7-dehidrosteroli se face pe cale chimică sub acțiunea steroldehidrogenazelor. 7-Dehidrosterolii care îndeplinesc rolul de provitamine D s-au identificat în diferite produse naturale. Ei se pot forma și la nivelul intestinului subțire, sub acțiunea unor dehidrogenaze specifice, cu consum de energie chimică.

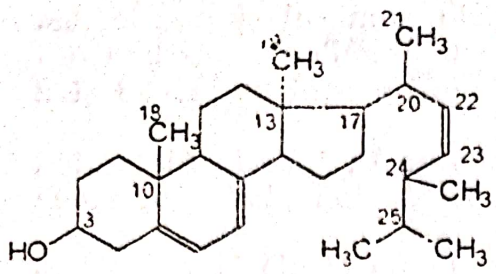
Structura moleculară simplificată a principalelor provitamine D se prezintă în figura 3.2.

Toate vitaminele D au o grupare hidroxilică liberă la C-3 din inelul A, inelul B deschis, cu trei duble legături conjugate, un nucleu indanic și o catenă laterală legată la C-17 a nucleului indanic, caracteristică fiecărei vitamine. Catenele laterale ale vitaminelor D sunt identice cu cele ale provitaminelor din care se formează și se deosebesc între ele prin numărul atomilor de carbon și prin prezența sau absența unei duble legături. Dintre vitaminele D, putere biochimică mai mare o au vitaminele D_2 și D_3. Vitamina D_7 are o putere vitaminică de 10 ori mai mică decât a vitaminei D_3. Puterea vitaminică depinde atât de structura moleculară a vitaminelor cât și de speciile asupra cărora acționează. În figura 3.3 se prezintă structura moleculară simplificată a principalelor vitamine D.

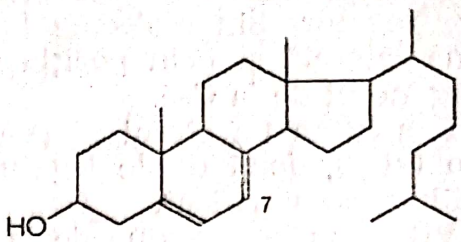
Dublele legături conjugate din inelul B deschis sunt situate între atomii de carbon C-10 — C-18; C-5 — C-6; C-7 — C-8, iar la nivelul catenei laterale între atomii C-22 și C-23. La unele vitamine de atomul C-24 se leagă un metil (D_2), respectiv un radical etil (D_5, D_6). Capătul terminal al catenelor laterale este ramificat, terminânduse în izopropil.

Toate vitaminele D derivă din steroli și toate au același schelet de bază. Ele diferă una de alta prin catena laterală, care în funcție de numărul atomilor de carbon, a substituenților pe care îi conțin, prin prezența sau absența unei duble legături, dau caracterul particular și specific al vitaminei respective. Orice modificare a complexului ciclic pentanoperidrofenantrenic din molecula provitaminelor D, face imposibilă transformarea acestora în vitamine. În cazul provitaminelor D, foarte importantă este și prezența dublei legături din inelul B dintre atomii C-7 și C-8, fără de care sterolii nu se pot transforma în vita-

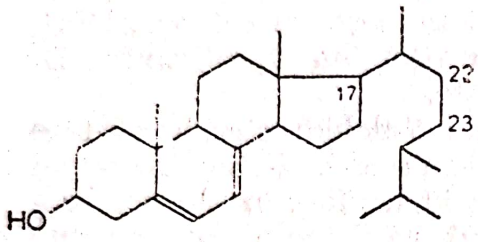
Scanned with OKEN Scanner



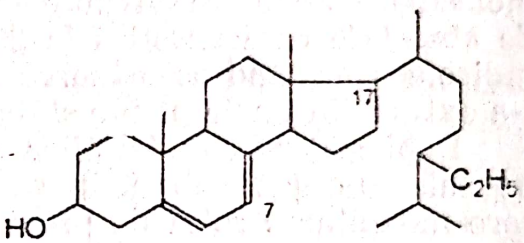
Ergosterol
(provitamina D_2)



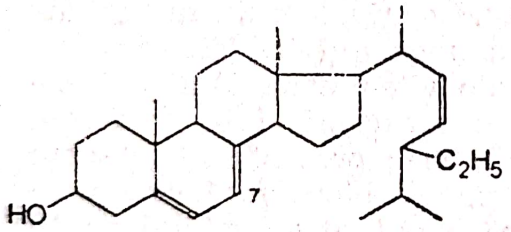
7 - Dehidrocolesterol
(provitamina D_3)



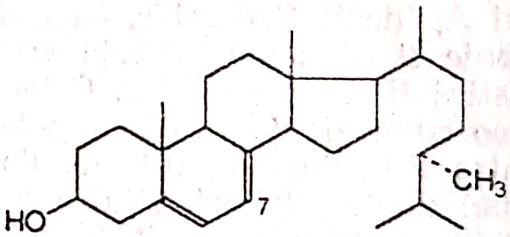
22 - Dihidroergosterol
(provitamina D_4)



7 - Dehidrositosterol
(provitamina D_5)



7 - Dehidrostigmasterol
(provitamina D_6)



7 - Dehidrocampesterol
(provitamina D_7)

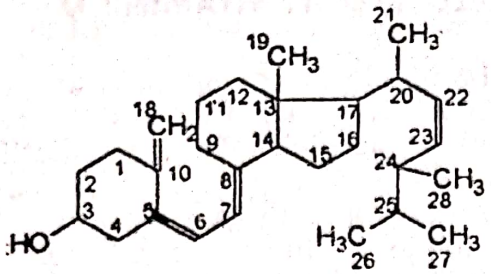
Fig. 3.2. Structura moleculară simplificată a principalelor provitamine D

mine D, decât numai în urma unei reacții de dehidrogenare, localizată la atomii C-7 și C-8. Colesterolul numai după transformarea sa în 7-dehidrocolesterol se poate transforma sub acțiunea radiațiilor ultraviolete în vitamina D_3.

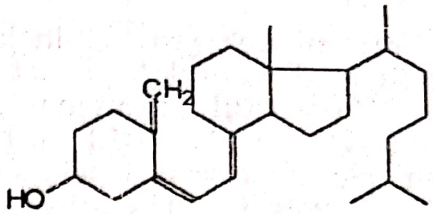
Toate vitaminele D au acțiune antirahitică, dar se deosebesc între ele prin intensitatea acestei acțiuni, care la rândul ei depinde de felul catenei laterale și de specia asupra căreia acționează. Astfel, vitamina D_3 este mai activă la om decât vitamina D_2, dar ambele au aceiași eficiență vitaminică asupra șobolanilor. Vitamina D_2 are o activitate vitaminică de aproximativ 1 000 de ori mai mică asupra puilor de găină decât asupra copiilor.

Activitatea vitaminică comună a tuturor vitaminelor D este determinată de prezența nucleului indanic, a hexaciclului A și a celor trei duble legături conjugate din inelul deschis B. Esterii vitaminelor D

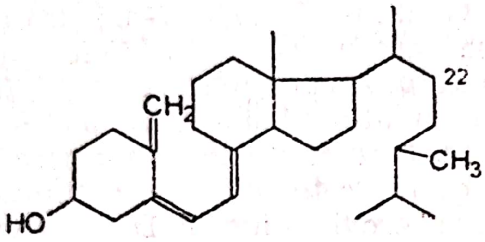
Scanned with OKEN Scanner



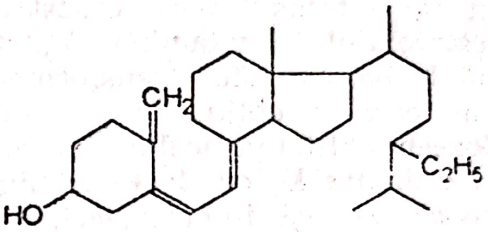
Vitamina D_2
(Calciferol)



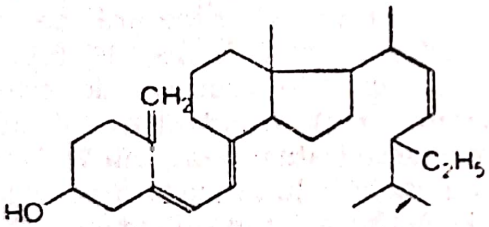
Vitamina D_3
(Colecalciferol)



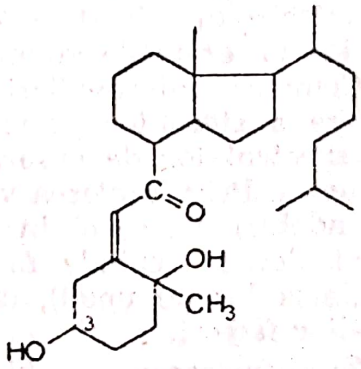
Vitamina D_4
(22 - Dihidroergosterol)



Vitamina D_5
(7 - Dehidrositosterol)



Vitamina D_6
(7- Dehidrostigmasterol)



Vitamina D_7
(Cetona 250_3)

Fig. 3.3. Structura moleculară simplificată a principalelor vitamine D

sunt inactivi, fapt ce confirmă că gruparea OH liberă contribuie la stabiliare activității vitaminice. Epimerizarea grupării OH duce la o slăbire a activității vitaminice. Vitaminele au o așa-numită „specificitate de specie", deoarece nu au aceiași eficacitate asupra tuturor speciilor animale și o „specificitate de compus", determinată de structura catenei laterale. Vitamina D_6 cu toate că are o catenă laterală asemănătoare cu cea a vitaminei D_2, la C-24 are ca substituent etil și nu metil, are o activitate vitaminică cu mult mai slabă decât a vitaminei D_2 (SORU, 1958).

Scanned with OKEN Scanner

3.3. TRANSFORMAREA PROVITAMINELOR D ÎN VITAMINE D

Trasformarea provitaminelor D în vitaminele D corespunzătoare se face în mod natural la om și la animale în piele, iar în cantitate redusă și în țesutul subcutanant, sub acțiunea energiei solare, a radiațiilor ultraviolete (256—313 nm) printr-un proces fotochimic, cu consum de energie exterioară. Unele substanțe fotosensibilizate ca eozina și eritrozina, dizolvate în soluții cu provitaminele D măresc randamentul de transformare a acestora în vitamine D. Experimental, acest proces se poate realiza de asemenea din provitamine supuse iradierii și altor surse de energie, cum sunt razele catodice, emanațiile radiului și a altor elemente radioactive, cu radiații de înaltă frecvență etc.

Transformarea provitaminelor D în vitamine, s-a cercetat mai mult în cazul transformării ergosterolului în vitamina D_2 și a 7-dehidrocolesterolului în vitamina D_3, stabilindu-se mecanismul fotochimic care stă la baza acestor transformări, precum și produșii intermediari și finali care se obțin. Cercetările ulterioare cu alte vitamine D, au evidențiat existența aceluiași mecanism de bază în procesul de formare a vitaminelor D, cu deosebiri mai ales în ce privește felul și conținutul unor compuși intermediari. Transformarea provitaminelor D în vitamine se realizează printr-un proces fotochimic ireversibil, sub acțiunea radiațiilor ultraviolete, fiind dependent de lungimea de undă a radiațiilor absorbite și de felul provitaminei.

Ergosterolul absoarbe radiații ultraviolete cu lungimea de undă cuprinse între 260 și 300 nm (260, 270, 280, 293), având absorbția cea mai eficace (maximă) la 280 nm. Energia luminoasă necesară pentru a obține un gram de vitamină D_2 din ergosterol, ar fi de 3×10^{21} fotoni.

Compușii intermediari și cei finali care apar în procesul de transformare a sterolilor provitaminici în vitamine D diferă între ei atât prin spectrul lor de absorbție, cât și prin activitatea vitaminică și cea fiziologică. Prin iradierea vitaminelor D cu radiații luminoase o perioadă mai îndelungată, se obțin compuși toxici. Acțiunea luminii asupra provitaminelor D depinde foarte mult atât de felul radiațiilor absorbite (lungimea lor de undă), de timpul de acțiune, de prezența oxigenului și a altor factori.

Transformarea fotochimică a ergosterolului în vitamina D_2 începe cu transformarea poziției metilului de la C-10, din poziția cis, în poziția trans, printr-o deplasare a sa în raport cu planul moleculei. In urma acestei fotoizomerizări se obține lumisterolul, care este izomer cu ergosterolul, dar care nu mai reacționează cu digitonina, reacție caracteristică cis-sterolilor. Lumisterolul se obține ca produs intermediar și în cazul iradierii 7-dehidrocolesterolului, 22-dihidroergosterolului, 7-dihidrositosterolului etc., datorită prezenței celor trei duble legături conjugate din inelul B, care este deschis între C-9 și C-10. Lumisterolul prezintă benzi de absorbție mai intense la 265, 280 nm având maximul de absorbție la 290 nm. Se obține în cantitate mare prin iradierea ergosterolului cu radiații ultraviolete la 290—300 nm. Este puțin sensibil la acțiunea oxigenului și nu precipită cu digitonina. Nu prezintă activitate vitaminică în rahitismul experimental.

Sub acțiunea radiațiilor ultraviolete, lumisterolul poate suferi o rupere a legăturii covalente din inelul B, situată între C-9 și C-10, cu

Scanned with OKEN Scanner

formarea unui nou compus intermediar, numit tahisterol, care are în plus față de ergosterol și lumisterol, o dublă legătură situată între atomii de carbon C-1 și C-10, conjugându-se cu cele două duble legături existente în inelul deschis B. Legăturile duble conjugate din tahisterol, încep la atomii de carbon C-10, C-5 și C-7. Tahisterolul se obține în cantitate mare prin iradierea ergosterolului și calciferolului la 254 nm, prin reacții reversibile. Tahisterolul nu are acțiune antirahitică, dar stimulează absorbția calciului și creșterea conținutului său în serul sanguin. Tahisterolul prin hidrogenare la nivelul dublei legături situată între C-5 și C-6, se transformă în dihidrotahistelor (figura 3.4), cunoscut în farmacii sub numele de compus antitetanic 10" (AT_{10}), deoarece are un efect de 10 ori mai mare decât tahisterolul în tratamentul profilactic și curativ al tetaniei. Dihidrotahisterolul are maxime de absorbție în zona ultravioletă la 242, 251, 261 nm, fiind mai mici decât ale tahisterolului, care are benzi de absorbție la 268, 280, 294 nm, datorită întreruperii dublelor legături conjugate. Are activitate vitaminică de 500 de ori mai mică decât a calciferolului.

În continuarea proceselor fotochimice, prin iradierea tahisterolului se produce o delocalizare a dublei legături situată între atomii C-1 și C-10, situându-se în urma deplasării între atomii de carbon C-10 și C-18, cu transformarea concomitentă a radicalului metil (-CH_3, notat cu C-18), legat de C-10, în radical metilen (=CH_2), obținându-se astfel vitamina D_2 numită și calciferol sau ergocalciferol, care are activitate antirahitică pronunțată. În mod similar se formează și celelalte vitamine D din provitaminele corespunzătoare, prin același mecanism de bază, iar activitatea vitaminică a produșilor care se obțin în acest proces, se intensifică odată cu apariția celei de a treia duble legături conjugate.

Din punct de vedere chimic, vitaminele D sunt izomeri fotochimici ai provitaminelor corespunzătoare, de care se deosebesc prin deschiderea inelului B între atomii C-9 — C-10, prezența a trei duble legături conjugate în inelul deschis B și transformarea metilului de la C-18 în metilem.

Vitaminele D sunt instabile sub acțiunea luminii. Prin iradierea acestora o perioadă mai lungă se obțin compuși chimici cu acțiune toxică dintre care s-au identificat toxisterolul (absorbție maximă la 248 nm), suprasterolii I și II, pirocalciferoli, izopirocalciferoli, fotocalciferoli, fotoizocalciferoli etc.

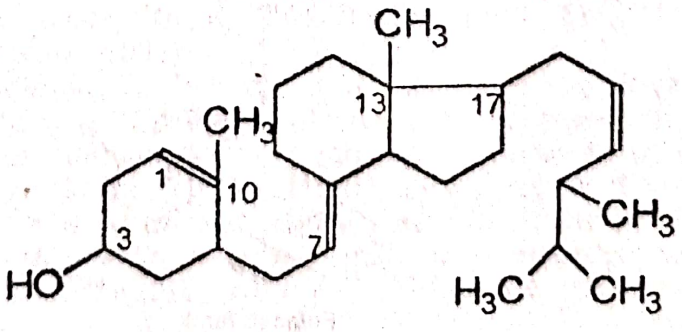


Fig. 3.4. Structura dihidrotahisterolului

Scanned with OKEN Scanner

În figura 3.5 se prezintă schema simplificată a transformării ergosterolului în vitamina D_2 și a acesteia în diferiți compuși toxici.

Pe baza descoperirii ulterioare a reversibilității unor reacții între unii compuși intermediari și a identificării precalciferolului, se admite în prezent schema de reacții prezentată în figura 3.6, privind transformarea ergosterolului în vitamina D_2.

Precalciferolul este instabil și prin simplă încălzire, suferă o rearanjare a dublelor legături cu apariția grupării metilenice ($C=CH_2$) la C-10, formându-se astfel vitamina D_2.

Prin suprairadierea calciferolului și prin încălzire, se obține un amestec de compuși toxici, în special suprasteroli și toxisteroli, care prin încălzire sub acțiunea hv, se transformă în piro- și izopirocalcife-

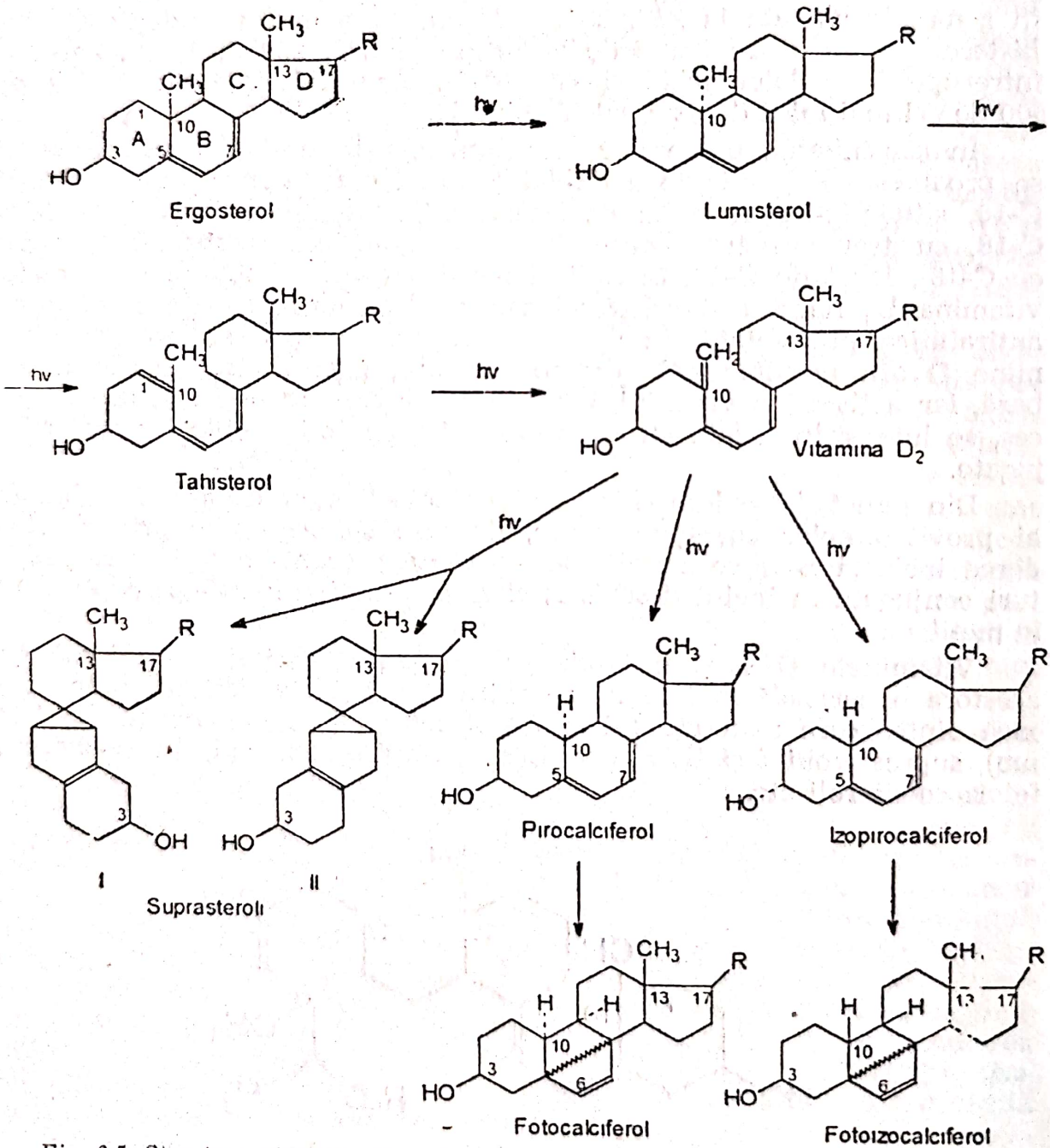


Fig. 3.5. Structura simplificată a transformării ergosterolului în vitamina D_2 și în compuși toxici

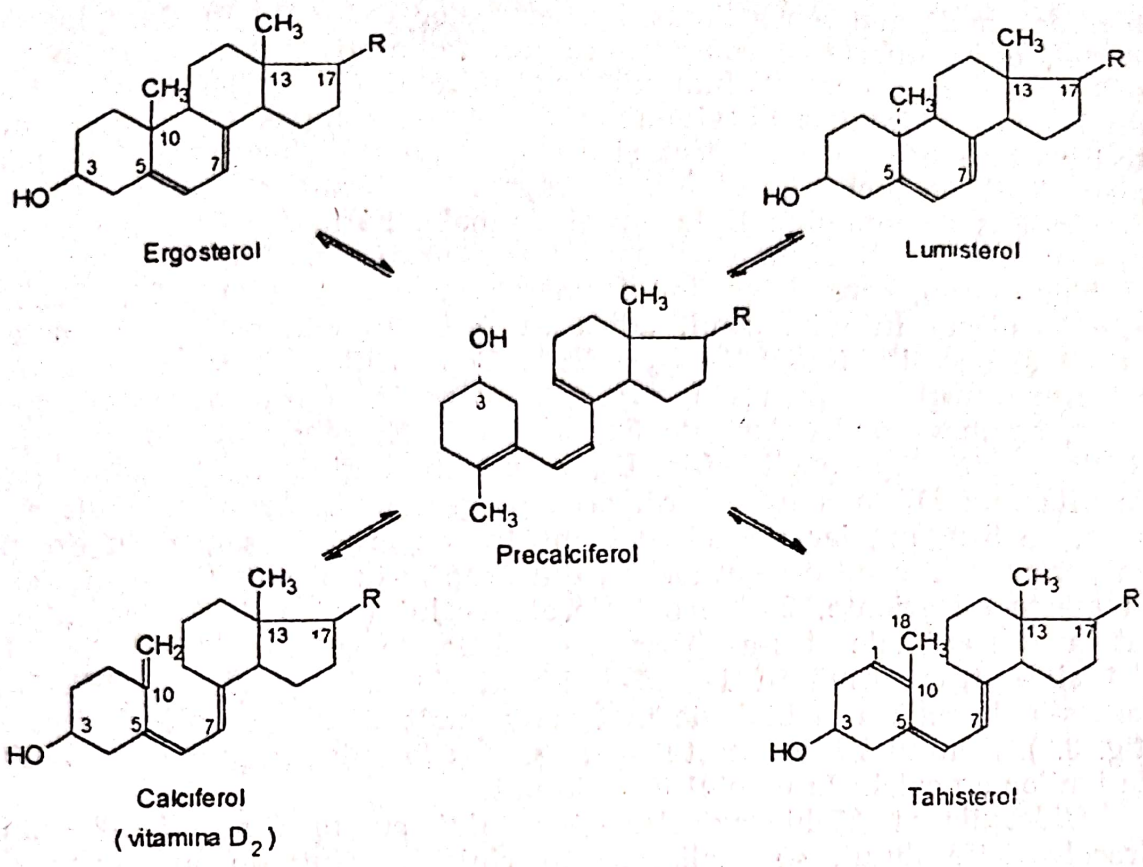


Fig. 3.6. Transformarea ergosterolului în vitamina D_2

roli, iar aceştia la rândul lor, prin încălzire la peste 125°C, se transformă în foto şi izofotocalciferoli. Precalciferolii au o activitate biologică mai redusă decât a vitaminelor pe care le formează. Suprasterolii, pirocalciferolii, fotocalciferolii şi izomerii acestora sunt lipsiţi de activitate vitaminică, iar în doze de 100 μg devin toxici şi determină totodată efecte hipercalcemiante puternice. Prin ruperea inelului B din molecula sterolilor se formează secosteroli cu 3 inele ciclice, spre deosebire de steroli care conţin 4 inele ciclice condensate.

Cercetările efectuate în ultimii ani, în diferite ţări, privind precursorii vitaminei D_3, au confirmat rezultatele cercetărilor anterioare, că 7-dehidrocolesterolul, compus prezent în mod obişnuit la om şi animale în piele, mucoasa intestinală etc., se transformă sub acţiunea luminii solare în colecalciferol (ZAESLEIN, 1982; ENESCU, 1990; CRISTEA-POPA şi colab., 1991).

Calea principală de biosinteză a vitaminei D_3 constă în transformarea fotochimică a 7-dehidrocolesterolului prezent în piele. Majoritatea alimentelor naturale conţin puţine vitamine D în stare liberă, cu excepţia uleiului de peşte, a midiilor, stridiilor, untului, a gălbenuşului ouălor etc., sau a unor produse naturale iradiate. Preparatele comerciale de vitamină D_2 se obţin prin iradierea drojdiilor cu radiaţii ultraviolete. Un om adult are nevoie zilnic de aproximativ 20 μg de vitamină D_2 sau D_3.

Prin experimente cu atomi radioactivi, s-a pus în evidenţă existenţa unor derivaţi oxigenaţi ai vitaminelor D_2 şi D_3, cu activitate vi-

taminică mult mai mare decât a vitaminelor existente în stare liberă. Astfel, după injectarea colecalciferolului radioactiv în sânge și în țesuturi, s-a identificat 25-hidroxicolecalciferolul (25-(OH)-D_3), care este un compus hidroxilat al vitaminei D_3. Acest compus s-a dovedit ulterior că se formează în ficat și are o activitate vitaminică mult mai mare decât a colecaciferolului. El reprezintă forma cu conținutul cel mai ridicat de vitamine D la om și animale. Formarea acestui compus se realizează în ficat, sub acțiunea unei enzime specifice (cocalciferol-D_3-hidroxilaza), care determină formarea grupării OH la C-25. Enzima este localizată în microzomi, adică în reticulul endoplasmatic neted (REN) și necesită NADPH+O_2+Mg^{2+}. Compusul 25-hidroxicolecalciferol este transportat prin sânge legat de o proteină transportatoare specifică, cu masa moleculară de 52.000 UMA. El reprezintă forma principală de circulație a vitaminei D_3, având un conținut de 30 ng/ml, față de vitamina D_3 în stare liberă, care se găsește în cantitate mult mai mică, de 5 ng/ml, iar uneori se identifică cu greu în sânge, cu excepția perioadelor când este absorbită din hrană sau biosintetizată în piele. În aceste experiențe, 25-hidroxicolecalciferolul radioactiv, a fost injectat la alte animale și s-a observat că și acesta suferă o hidroxilare la C-1 și se transformă în 1-α-25-dihidroxicolecalciferol (1, 25-$(OH)_2$-D_3), care s-a dovedit a fi biologic mai activ decât 25-hidroxicolecalciferolul (fig. 3.7). Administrarea acestui nou compus la animale grăbește absorbția ionilor de calciu la nivelul intestinului.

Hidroxilarea 25-hidroxicolecalciferolului cu formarea 1-α-25-dihidrocolecalciferolului, se realizează în rinichi, printr-un mecanism de hidroxilare similar biosintezei hormonilor steroidici în corticosuprare-

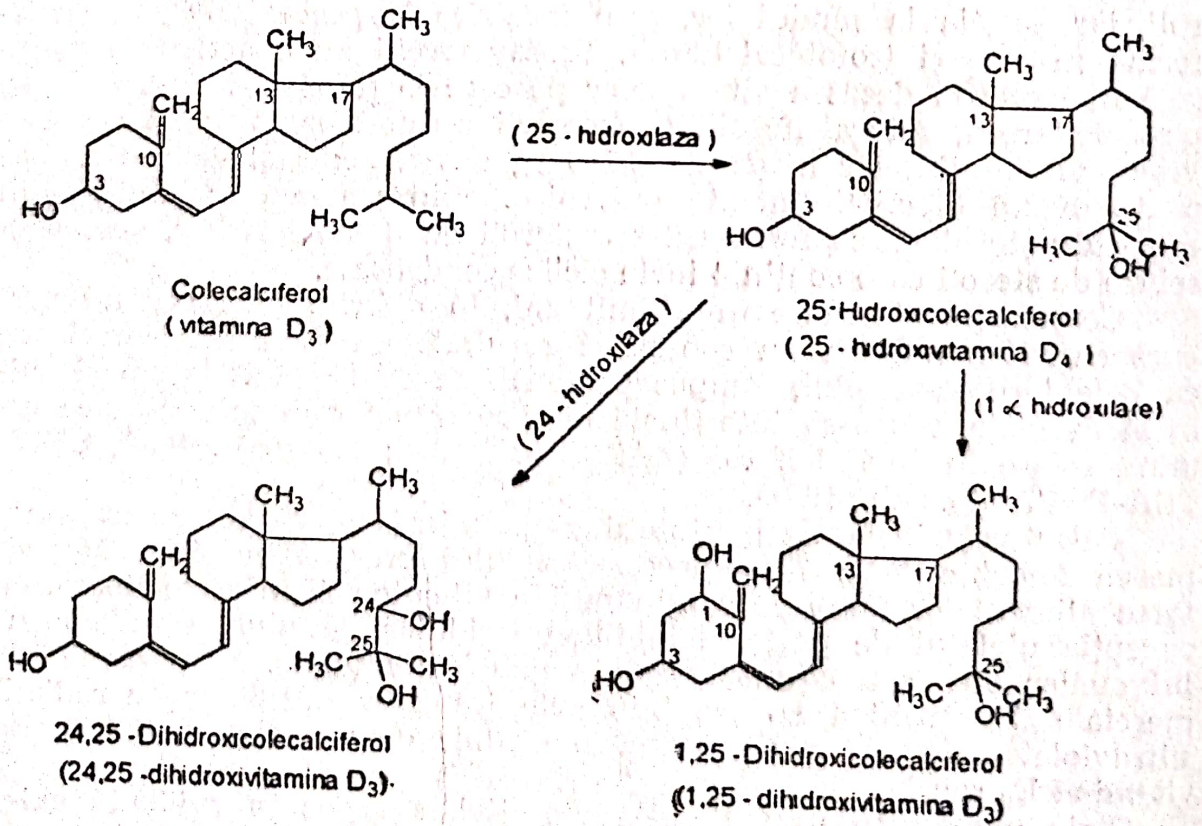


Fig. 3.7. Structura 1-α-25-dihidroxicolecalciferolului

Scanned with OKEN Scanner

nale, cu ajutorul unui sistem enzimatic, localizat în membrana internă a mitocondriilor, care cuprinde o flavoproteină (fierredoxinreductaza), NADPH, o proteină cu fier și sulf (fierredoxinarenală) și citocrom P450. 1, 2-Dihidroxicolecalciferolul este transportat de la rinichi la nivelul intestinului cu ajutorul unor proteine transportatoare ale vitaminelor D, unde declanșează procesele necesare absorbției ionilor de calciu. 1, 25-Dihidroxicolecalciferolul reprezintă forma cea mai activă a vitaminei D_3, care acționează direct asupra oaselor și a intestinului subțire. Acest compus este considerat de cercetători, drept hormon, dacă se ia în considerare definiția clasică a hormonilor, adică substanțe secretate de glande sau țesuturi, transportați de sânge la țesuturile unde își manifestă activitatea biologică (LEHNINGER, 1987). Astfel, 1, 25-dihidroxicolecalciferolul este biosintetizat în rinichi, este transportat de sânge la intestin și sistemul osos, unde își exercită activitatea biologică. Se deosebește de hormonii propriu-ziși prin faptul că precursorii săi trebuiesc luați din hrană. Acest „semihormon" stimulează biosinteza unor proteine specifice care participă la legarea și transportul Ca^{2+} prin mucoasa intestinală. Activitatea sa este corelată sinergic cu a hormonului paratiroidian (parathormon), format din 84 de aminoacizi. Dacă concentrația ionilor de calciu din sânge scade sub valoarea normală, se intensifică activitatea glandelor paratiroide, crește conținutul hormonului paratiroidian, care acționează asupra rinichilor, determinând intensificarea formării 1, 25-dihidroxicolecalciferolului și eliminarea unei cantități sporite de fosfați prin urină. Hormonul paratiroidian este deci un hormon tropic, deoarece stimulează secreția sau biosinteza altui hormon.

1,25-Dihidroxicolecalciferolul se formează în tubii renali, așa după cum s-a menționat, dar s-a găsit în cantități mici și în oase și placentă. El se formează sub acțiunea enzimei 25-hidroxicolecalciferol-1-α-hidroxilaza. Acest compus, este singura formă naturală a vitaminelor D, capabilă să mențină nivelul calciului seric la valori normale, în condiții obișnuite de viață, fără intervenția renală sau cea paratiroidiană, fapt pentru care mai nou se numește 1,25-dihidroxi-vitamina D_3 ($1,2\text{-}(OH)_2\text{-}D_3$).

În privința activității derivaților oxigenați ai colecalciferolului, s-a raportat că 25-dihidroxacalciferolul injectat la animale este de 4—5 ori mai activ decât vitamina D_3 în prevenirea rahitismului, iar compusul 1, 25-dihidroxicolecalciferolul este de 20—30 de ori mai eficient decât vitamina D_3 în transportul intestinal al ionilor de calciu și prevenirea rahitismului și de 10 ori mai activ în menținerea nivelului fosforului anorganic din sânge la animalele cu hrană săracă în fosfați (NORMAN, 1968; DE LUCA, 1973, BEDELEANU și colab., 1985).

Sub acțiunea altei enzime specifice din tubii renali, cartilagii, intestin sau placentă, 25-hidroxicolecalciferolul poate fi hidroxilat și la C-24, cu formarea unui nou compus vitaminic, numit 24, 25-dihidroxicolecalciferolul ($24, 25\text{-}(OH)_2\text{-}D_3$), a cărui conținut în serul sanguin se află în relație reciprocă cu cel al 1, 25-dihidroxicolecalciferolul. Conținutul acestor compuși vitaminici D_3 în sânge este reglat fie direct de către hormonul paratiroidian, fie indirect, de conținutul calciului seric.

Scanned with OKEN Scanner

Compusul 24, 25-$(OH)_2$-D_3 este mai puțin activ decât izomerul său 1, 2-$(OH)_2$-D_3 în ce privește transportul intestinal al ionilor de calciu în procese de mineralizare, acțiune antirahitică, dar este capabil să determine creșterea conținutului Ca^{2+} în sânge la șobolanii cu depletie de fosfați. Cei doi compuși dihidroxilați ai colecalciferolului, administrați per os împreună, în raport echimolecular, sunt extrem de eficienți în vindecarea osteomalaciei la persoanele aflate în carență de vitamină D.

La om și animale s-a remarcat existența unei corelații biochimice între provitamine D — vitamine D și derivați oxigenați ai vitaminelor D, care se poate reda prin următoarea relație:

$$\text{Provitamine D} \xrightarrow[\text{Raze UV în piele}]{\text{Activare primară}} \text{Vitamine D} \xrightarrow[\text{în ficat}]{\text{Prima activare secundară}} \text{Derivați OHD}$$

$$\xrightarrow[\text{în rinichi}]{\text{A doua activare secundară}} \text{Derivați } (OH)_2\text{—D}$$

3.4. PROPRIETĂȚI FIZICE ȘI CHIMICE GENERALE ALE VITAMINELOR ȘI PROVITAMINELOR D

Vitaminele D sunt substanțe liposolubile, termostabile până la 180°C. Nu reacționează cu digitonina, prezintă activitate optică, au o rezistență mai mare decât celelalte vitamine liposolubile la acțiunea oxigenului.

Vitaminele D_2 și D_3 se prezintă sub formă de cristale incolore sau sub formă de pulbere cristalină albă, fără gust și miros. Sunt insolubile în apă, dar sunt ușor solubile în uleiuri vegetale și animale, alcool, cloroform, acetonă, dioxan etc. Rezistă bine la încălzire sub 100°C, dar se distrug total în 4 ore la 180°C. Sunt sensibile la oxidanți și chiar la oxigenul din aer, expuse un timp mai îndelungat, fapt pentru care se păstrează în atmosferă de azot. Au spectre de absorbție caracteristice care servesc la identificarea lor. Soluțiile emulsionate ale vitaminelor D pierd din activitatea lor la temperaturi sub 0°C.

Sub acțiunea luminii și prin încălzire, preparatele farmeceutice cu vitamine D se transformă în precalciferol, care în aceste condiții posedă numai 35% din activitatea vitaminică. Întrucât aceste transformări sunt reversibile prin răcire, se recomandă păstrarea în frigider a soluțiilor în prealabil încălzite, o anumită perioadă limitată de timp. Soluțiile injectabile se pot prepara prin dizolvarea vitaminelor D în uleiuri vegetale sau într-un amestec de etanol anhidru și propilenglicol, luate în raport de 1 : 9. Sub această formă, preparatele vitaminice suportă autoclavarea în atmosferă de azot și se pot utiliza la obținerea unor preparte alimentare miscibile cu lapte recomandate pentru copii, putând fi astfel administrate pe cale orală. În siropuri, vitaminele D pot fi solubilizate cu ajutorul polisorbatului 80, fiind însă necesară protejarea lor cu antioxidanți, cum sunt butilhidroxitoluenul și galatul de etil, asociate cu acidul ascorbic sau cu acidul citric (BEDELEANU și colab., 1985).

Scanned with OKEN Scanner

Ergosterolul cristalizează din alcool etilic sub formă de cristale mici incolore, cu o moleculă de apă de cristalizare, pe care o pierde cu greu. Cu 1,5 molecule de apă de cristalizare, acest sterol are punctul de topire la 168°C. Din eter etilic și acetat de etil, ergosterolul cristalizează fără apă, sub formă de ace higroscopice. Sub formă de soluție 2%, în cloroform, ergosterolul prezintă activitate optică levogiră (—) 130°. Distilează în vacuum la 250°C fără descompunere.

Provitamina D_3 (7-dehidrocolesterolul) este cea mai importantă provitamină D pentru om și animalele superioare. Se găsește în cea mai mare parte în piele, iar sub acțiunea luminii solare se transformă în colecalciferol. Cristalizează sub formă de plăci dintr-un amestec de alcool și eter etilic. Se topește la 142—143,5°C, iar în soluție de cloroform rotește planul luminii polarizate la stânga, cu (—) 113,6°. Maximul de absorbție în regiunea ultravioletă a spectrului solar este la 281 nm. Precipită cu digitonina, iar cu $SbCl_3$ dă în final o culoare albastră.

Provitamina D_4 (22-dihidroergosterolul) are punctul de topire la 152°C, cristalizează ușor din alcool și are activitate optică levogiră (—) 109°.

Provitamina D_5 (7-dehidrositosterolul), se prezintă sub formă de cristale, cu punct de topire la 144—145°C și activitate optică levogiră (—) 116° în cloroform. Celelalte proprietăți sunt similare ergosterolului.

Provitamina D_6 (7-dehidrostigmasterolul), cristalizează cu ușurință din etanol și eter etilic. Cristalele au punct de topire la 154°C, iar în soluție prezintă activitate optică levogiră, rotind planul luminii polarizate cu (—) 113,5° în benzen.

Vitaminele și provitaminele D sunt mai stabile în mediu bazic sau slab acid, decât în cel puternic acid. Vitaminele D nu se alterează în procesul de saponificare a grăsimilor. Acizii minerali concentrați, apa oxigenată, aldehida formică, permanganatul de potasiu alterează activitatea vitaminelor D. Prin încălzirea soluțiilor uleioase ce conțin vitamine D, între 77 și 115°C în lipsa oxigenului, vitaminele D își păstrează un timp îndelungat proprietățile antirahitice.

3.5. METODE DE IDENTIFICARE ȘI DOZARE

Atât vitaminele cât și provitaminele D se pot identifica prin metode spectrofotometrice, pe baza lungimilor de undă a radiațiilor absorbite în lumină ultravioletă. Dozarea lor se poate face de asemenea prin metode spectrofotometrice, citind absorbția benzii maxime la 265 nm în UV.

Metodele chimice nu sunt caracteristice pentru fiecare vitamină sau provitamină D în parte, și nu dau reacții suficient de specifice. Cu toate aceste neajunsuri, se folosesc numeroase reacții pentru identificarea și dozarea vitaminelor și a provitaminelor D.

Reacția Salkovsky. Prin tratarea sterolilor provitaminelor D și a vitaminelor D în soluție cloroformică cu H_2SO_4 concentrat, se produce o colorare în roșu a părții de jos, unde se află cloroformul, iar acidul sulfuric primește o fluorescență verde.

Scanned with OKEN Scanner

Reacția Liebermann-Buchard. Dacă peste soluția cloroformică ce conține provitamine sau vitamine D se adaugă anhidrida acetică și acid sulfuric concentrat, se obține inițial o culoare roșie, care trece destul de rapid în albastru-violet și în final în verde. Dacă folosim colesterol pur în cloroform, coloratia roșie se păstrează un timp mai îndelungat.

Reacția Tortelli-Jaffe. Vitaminele și provitaminele D aflate în soluție de acid acetic, prin tratare cu o soluție de brom 2% în cloroform, dau o culoare verde.

Reacția Rosenheim. Dacă se tratează acid tricloracetic în soluție apoasă cu o soluție cloroformică de provitamine D se obține o culoare roșie, care trece treptat în albastru luminos. Apare de asemenea o fluorescență verde, care nu apare în cazul utilizării sterolilor esterificați. Această reacție poate servi la diferențierea provitaminelor D aflate în stare liberă, față de esterii lor corespunzători.

Reacția clorhidratului. Cristalele unor provitamine D, în amestec cu clorhidrat, dau prin încălzire, la 50°C o culoare roșie, care trece în verde și apoi în albastru intens. Colesterolul și sterolii care nu au duble legături pe catena laterală nu dau această reacție.

Reacția cu triclorura de stibiu. Triclorura de stibiu în soluție cloroformică dă cu o soluție cloroformică ce conține provitamine sau vitamine D o coloratie roșie. Ergosterolul, în soluție alcoolică apoasă, dă cu acidul sulfuric concentrat, o coloratie portocalie, la zona de contact, care trece în final în roșu. Colesterolul nu dă această reacție. Vitaminele D în soluție cloroformică, dau cu $SbCl_3$ o coloratie galbenă, cu un maxim de absorbție la 620 nm, fapt ce permite dozarea ambelor vitamine din același mediu de reacție. Metoda are o sensibilitate de 0,02—0,04 mg vitamină D.

Vitaminele D și provitaminele acestora, în soluție alcoolică, prin tratare cu $AlCl_3$ și pirogalol, dau o coloratie violetă. În prezența clorurii de acetil și a clorurii de zinc, provitaminele D dau o coloratie roșie, iar vitaminele D o coloratie verde.

Reacția cu $AlCl_3$ este dată și de tahisteroli.

Reacția cu PCl_5. Vitaminele D dau cu PCl_5 o coloratie roșu-brună. Reacția însă nu este specifică, fiind pozitivă și cu alte vitamine și hormoni.

Testele biologice se fac prin tratamente profilactice și curative în prevenirea și vindecarea rahitismului la diferite specii de animale. La puii de găină, rahitismul se instalează la o simplă carență de vitamine D, iar la șobolani numai prin alterarea raportului Ca/P din sânge, ce se realizează experimental prin adăugarea $CaCO_3$ 2% în hrană și menținerea animalului la întuneric.

Prin *teste biochimice* se face dozarea fosfaților anorganici din sânge, cu molibdat de amoniu. La animale și la copii rahitici, fosforul anorganic din sânge scade la jumătate din valoarea sa normală.

Foarte utilă este de asemenea dozarea fosfatazelor alcaline din sânge, a căror conținut crește de 2—5 ori la persoanele și animalele cu rahitism, fiind primul semn clinic care apare la instalarea rahitismului și ultimul care dispare la vindecarea bolii. La șobolani nu se înregistrează asemenea modificări.

Scanned with OKEN Scanner

Testele clinice stabilesc necesarul de vitamine D pentru vindecarea bolilor care apar în stări carențiale ale vitaminelor D sau în cazuri de hipervitaminoze. Testele clinice, biologice și biochimice se efectuează cu vitamine D numai pe șobolani, întrucât efectele sunt similare cu simptomele care apar la oameni în rahitism și osteomalacie. Nu se mai folosesc puii de găină, întrucât manifestă o slabă receptivitate la acțiunea vitaminelor D_2 și D_3.

Pe baza cercetărilor efectuate s-a stabilit că în apariția rahitismului la copii și animale, un rol important îl are raportul din conținutul calciului și al fosforului (Ca/P). Dacă acest raport este modificat de la valoarea sa normală, rahitismul apare chiar și în prezența vitaminelor D. În schimb, dacă raportul Ca/P este de 2 : 1, nu apare rahitismul chiar în carențe incipiente ale vitaminelor D. Dacă raportul Ca/P are valori între 3,5 și 10, apar leziuni rahitice pronunțate, care se intensifică în lipsa vitaminelor D.

Se fac de asemenea teste bazate pe modificarea conținutului substanțelor minerale din oasele animalelor rahitice, prin compararea cenușii brute din oase provenite de la animale sănătoase (lot martor) și animale (șobolani) rahitice.

Se mai efectuează testul cu azotat de argint, bazat pe determinarea recalcifierii oaselor, prin ținerea lor în soluție 2% de $AgNO_3$, timp de 1 minut, fiind apoi spălate cu apă distilată și expuse la soare până apare o colorație neagră, datorită depunerii argintului coloidal în părțile calcificate.

Se utilizează de asemenea, metode radiologice, care sunt rapide și eficace, punându-se ușor în evidență arcuirea picioarelor și piept de porumbel la persoanele rahitice.

3.6. SURSE DE VITAMINE D ȘI NECESITĂȚILE ORGANISMULUI UMAN

În stare liberă, vitaminele D se găsesc în cantitate mai mare în unele alimente de origine animală, cum sunt uleiul din ficat de pește (1 200—40 000 UI/g), ficatul de batoc, scrumbii de mare, heringi, untura de pește, gălbenușul ouălor (300 UI/100 g), untul de vacă (60 UI/100 g), în carnea peștilor marini etc. În organismele vegetale, vitaminele se găsesc predominant sub formă de provitamine și numai într-o proporție redusă în stare liberă. În alimente și în organismele animale o parte însemnată din vitaminele D se găsesc sub formă de provitamine, care sub acțiunea razelor ultraviolete, se vor transforma în piele, în vitaminele corespunzătoare. În tabelul 3.1 se prezintă conținutul provitaminelor D din unele produse naturale.

După cum rezultă din datele prezentate în tabelul 3.1, sunt mai bogate în provitamine D animalele nevertebrate, în special midiile, stridiile, anemonele și viermii marini, iar la plante, ovăzul, spanacul, iarba și uleiurile provenite din semințe germinate.

Necesitățile umane în vitamine D sunt asigurate atât prin transformarea provitaminelor din hrană în vitamine D cu ajutorul luminii

Scanned with OKEN Scanner

Tabelul 3.1

Conținutul provitaminelor D din unele surse naturale exprimat în g% steroli

Sursa	Conținut provitamine D (%)
Plante	
Alge	0,08
Iarbă	0,8
Ovăz	1,5
Spanac	1,0
Ulei din grâu încolțit	0,8
Varză	0,05
Animale nevertebrate	
Anemonii marine	2—10
Crab	0,32
Lipitoare	4,0
Midii	9—10
Stridii	5—6
Vierme marin	4—12
Animale vertebrate	
Carne de pasăre	0,01
Creier de vacă	0,01
Grăsime de pasăre	1—4
Pancreas vacă	0,18
Placentă vacă	0,18
Piele om	0,25—0,43
Piele vițel	0,68
Piele șoarece	0,87
Ser sanguin vacă	0,15

ultraviolete în stratul bazal al pielii, cât și prin absorbția vitaminelor D existente în stare liberă în alimente.

Necesitățile oamenilor adulți pentru vitaminele D sunt de aproximativ 400 UI/zi și sunt acoperite în mod normal din provitamine D din plante și din 7-dehidrocolesterol, găsit la animale, 7-Dehidrositosterolul, 7-dehidrocolesterolul și 22-dihidroergosterolul se găsesc în cantitate mică la om și la diferite specii de animale.

Animalele ierbivore își procură predominant vitaminele D din provitamine, iar animalele carnivore din vitamine libere. Pisica elimină o parte din vitaminele D prin glandele sebacee, dar le biosintezează în piele și prin blană. Păsările transformă provitaminele D în vitamine la nivelul penelor. Grăsimea cu provitamine o iau din glandele penelor, care unsă cu ciocul pe pene, se transformă sub acțiunea razelor UV în vitamine D, ce vor intra în corpul păsărilor prin ciugulirea penajului.

Peștii mici iau cea mai mare parte de vitamine libere din plancton pe care le depozitează în ficat. Peștii mari se hrănesc cu pești mici. Peștii care trăiesc în ape adânci, pe fundul mărilor și oceanelor, unde nu pătrund razele ultraviolete, reușesc să-și procure vitaminele D din provitamine, care se găsesc în pielea acestora, cu ajutorul probabil al razelor mitogenetice, radiații care se produc în celule în timpul creșterii organismelor. Peștii de la suprafața apelor dulci și marine care sunt supuși iradierii cu raze ultraviolete, transformă provitaminele D

Scanned with OKEN Scanner

luate din hrană (plancton, alge) în cea mai mare parte, în piele și solzi prin procesul fotochimic menționat și numai într-o proporție neînsemnată cu ajutorul radiațiilor mitogenetice.

La mamifere, vitaminele D se formează din provitaminele corespunzătoare în piele, sub acțiunea razelor ultraviolete, iar o parte neînsemnată se afirmă că s-ar forma și sub acțiunea radiațiilor mitogenetice. Derivații hidroxilați ai vitaminelor D iau naștere în ficat și rinichi, cu consum de energie chimică, sub acțiunea unor enzime specifice. Transformarea unor steroli se poate realiza și la nivelul intestinului, prin reacții chimice, sub acțiunea unor dehidrogenaze specifice, a sărurilor biliare etc., dar transformarea acestora în vitamine D necesită acțiunea radiațiilor luminoase. Concentrația 7-dehidrocolesterolului (provitamina D_3) este de 4,5% din conținutul total al sterolilor existenți în gălbenușul de ou și în grăsimea de porc și de 7% la nivelul intestinului subțire din conținutul colesterolului la om, confirmând că organismul uman își poate procura unele provitamine D din steroli, prin reacții chimice.

O parte relativ mică de vitamine D sunt preluate de mamifere în stare liberă din hrană.

Conținutul procentual al vitaminelor D din unele alimente se prezintă în tabelul 3.2.

Necesitățile generale ale omului și animalelor în vitamine D depind de conținutul acestora în hrană, de eficiența transformării provitaminelor D în vitamine, de starea fiziologică a organismelor, vârstă, perioade de creștere și lactație, de raportul dintre Ca/P din alimente, de diferitele afecțiuni hepatice, renale și gastrointestinale, de prezența unor compuși și medicamente rahitogene etc.

Necesarul zilnic de vitamine D la oameni în funcție de vârstă, se prezintă în tabelul 3.3.

Tabelul 3.2

Conținutul procentual al vitaminelor D din unele alimente exprimat în μg/g

Aliment	Conținut în μg/g
Ciuperci	12—31
Gălbenuș de ou (vara)	97,56
Gălbenuș de ou (iarna)	35,0
Lapte uman	1,50
Lapte de vacă (vara)	0,6—0,9
Lapte de vacă (iarna)	0,4—0,7
Legume verzi	0
Margarină	0
Pești marini	12,5—250
Smântână	12,5
Ulei din ficat de ton	75 000
Ulei de măsline	0
Ulei din ficat de morun	375
Unt de cacao	750
Unt de vacă (vara)	13,2
Unt de vacă (iarna)	2,0

Scanned with OKEN Scanner

Tabelul 3.3

Necesarul zilnic de vitamine D la oameni, în funcție de vârstă, exprimată în UI

Vârsta	Cantitatea de UI/zi corp
Copil sugar prematur	1 200—1 400
Copil sugar hrănit la sân	200—400
Copil hrănit artificial	400—700
Copii între 1 și 14 ani	400—600
Adolescenți (15—21 ani)	300—600
Adulți	300—400
Femei gravide	600—800
Femei care alăptează	600—800

Vitaminemia are valori variabile, în funcție de sezon, având la om valori cuprinse între 50 și 165 UI/100 ml ser, în medie 100 UI/100 ml ser. După o doză mare de vitamine D (600 000 UI) administrate experimental, conținutul vitaminelor are valori mari, peste 10.000 UI/100 ml sânge, fapt ce va determina dereglări metabolice specifice hipervitaminozelor.

La întocmirea meniurilor, trebuie să se țină seama și de conținutul vitaminelor D din alimente. În tabelul 3.4 se prezintă necesarul zilnic de vitamine D, adus de 100 g alimente.

Unitatea internațională (UI) de activitate a vitaminelor D este echivalentă cu activitatea dată de 0,25 μg de vitamină D_3 cristalizată, cu punctul de topire la 87—89°C, $D = +110°$, $E_1^{1\%}$ cm 260 nm = 490 (în etanol), obținută în condiții standard.

Tabelul 3.4

Necesarul zilnic de vitamine D la oameni, adus la 100 g alimente, exprimat în procente

Alimente	Conținutul vitaminelor D din 100 g alimente (%)
Lapte de vacă iarna	0,5
Lapte de vacă vara	1,0
Unt iarna	7,0
Lapte iradiat	4,0
Legume verzi	0
Fructe verzi	0
Unt vara	16
Morun	16
Ou întreg	23
Ciuperci	21
Gălbenuș de ou (iarna)	46
Scrumbii de mare	100
Heringi	100—300
Gălbenuș de ou (vara)	130
Sardele	600
Untură de pește	2 800

Scanned with OKEN Scanner

3.7. RESORBȚIA ȘI TRANSPORTUL VITAMINELOR D

Vitaminele D sunt resorbite din alimente la nivelul intestinului subțire, în prezența sărurilor biliare, care le emulsionează, și a lipidelor alimentare. Gradul de resorbție se apreciază a fi, în condițiile organismului sănătos de 80—95%, fiind mai mare în cazul soluțiilor mai diluate. Alterarea resorbției vitaminelor, prin administrarea de antivitamine, în infecții intestinale sau prin adăugarea uleiului de parafină care nu se resoarbe, determină o creștere a eliminării vitaminelor și provitaminelor D prin fecale, fapt ce va determina în final apariția rahitismului. În timpul absorbției prin mucoasa intestinală, vitaminele D se incorporează în chilomicroni, care vor fi transportați la ficat pe cale limfatică. Absorbția vitaminelor și transportul chilomicronilor durează 6—8 ore.

Vitaminele D administrate oral sunt absorbite în special în jejun, pe când absorbția în duoden este de mai mică importanță. În limfă, vitamina D_2 este prezentă mai ales sub formă de calciferol liber și numai o cantitate minoră este esterificată cu acizi grași monoetenici. Absorbția calciferolului are loc în două faze. La început se produce o absorbție rapidă în mucoasa intestinală, fiind apoi urmată de o eliberare lentă în limfă. Prin experiențe cu calciferol marcat, aproximativ 50% din vitamina D_2 a fost găsită în limfă după 18 ore de la administrare. Absorbția optimă a calciferolului necesită prezența sărurilor acidului taurocolic. Pentru transport în plasma sanguină, calciferolul este predominant legat de lipoproteine (chilomicroni) și ulterior de α-globuline. În prezența unor deficiențe pancreatice și în steatoree, absorbția vitaminelor D este oprită aproape complet. Viața biologică medie a vitaminelor D la oameni este de aproximativ 26 de ore, pe când cea a derivaților oxigenați, este de la 7 la 40 de zile. În experimentele cu calciferol marcat, numai 2,4% a fost găsit în urină după 48 ore de la administrare, sub formă de metaboliți organici legați de calciferol. Nu a fost găsită vitamina D în bilă. Excreția în fecale a fost între 3 și 6% din doza administrată. La șobolanii rahitici, pe de altă parte, după administrarea colecalciferolului cu tritiu, 35% din radioactivitate a fost găsită în fecale și în conținutul intestinal după 25 de ore. Distribuirea radioactivității în organe a fost următoarea: în ficat între 5,7 și 9,2%, în oase între 3,9 și 20,3%, în mușchi 0,8—8,4%, în intestine 1,7—2,5%, în țesutul conjunctiv 5,6%.

H. F. DE LUCA (1969) și E. KODICEK (1970) au izolat din ficat de șobolan, un metabolit polar al colecalciferolului, numit 25-hidroxicolecalciferol, cu o activitate biologică de 2,5 ori mai mare ca a colecalciferolului, care se crede că induce sinteza sistemului proteic necesar pentru transportul calciului (CaBP). Același grup de cercetători au descoperit ulterior în rinichi un metabolit și mai polar al vitaminei D_3 numit 1, 25-dihidroxicolecalciferol, care este forma cea mai activă a vitaminelor D în absorbția și depozitarea calciului.

În sânge, vitaminele D sunt transportate de proteine transportoare specifice (CaBP), secretate în ficat, fiind cuplate cu α_2-globuline și mai puțin cu α_1-globuline. O parte din vitaminele D vor fi depozitate în ficat, unde se vor esterifica în proporție de 10%, iar cea mai

Scanned with OKEN Scanner

mare parte se vor hidroliza, obținându-se diferiți derivați oxigenați cu activitate vitaminică mare.

Eliminarea vitaminelor D și a metaboliților acestora se face prin fecale, piele, bilă. Urina în general nu conține vitamine D cu excepția existenței unor afecțiuni renale. Sesizarea unor cantități foarte mici de vitamine D în urină este nesemnificativă.

Vitaminele D luate din hrană sub formă de esteri vor suferi la nivelul intestinului un proces de dezesterificare și pe urmă vor fi resorbiți prin membrana intestinală. Esterii vitaminelor D nu sunt resorbiți în organism. Vitaminele D se depozitează în cea mai mare parte în ficat, iar în cantități mai mici în mușchi, rinichi, plămâni, piele, creier, suprarenale etc. De la mucoasa intestinală vitaminele D sunt transportate prin circulația limfatică în sânge, unde se vor cupla cu proteina transportoare.

Unii cercetători afirmă că lipidele din alimente au un rol favorizant în ce privește absorbția vitaminelor D, similar absorbției vitaminelor A. Dizolvarea vitaminelor D într-o emulsie fină de grăsimi, ajută fără îndoială absorbția vitaminelor prin mucoasa intestinală. Acest proces este analog cu dizolvarea vitaminelor D în lapte, întrucât acest amestec are o mare valoare antirahitică la sugari. Experimental s-a arătat că vitaminele D sunt mai bine resorbite în organism dacă sunt administrate cu lapte, unt, ulei de pește, decât în stare liberă.

În anii 1960, s-a pus în evidență în intestinul de găină (WASSERMAN, 1963, 1966) existența unei enzime dependentă de vitamina D, numită proteină calcipexică (CaBP=calcium binding protein), care ușurează absorbția intestinală a calciului. Experimental s-a stabilit existența unei corelații directe între momentul biosintezei enzimei CaBP și creșterea absorbției și a transportului de calciu.

Vitaminele D și derivații lor oxigenați stimulează biosinteza enzimei CaBP, care se găsește de-a lungul intestinului subțire și în colon, unde acționează vitaminele D. Ulterior, enzima CaBP s-a identificat și în ficat, rinichi, tiroidă la om, precum și la șobolani, câini, maimuțe, vaci, porci, în oviductul găinilor, cu rol posibil în formarea cojii ouălor.

Este de asemenea cunoscut că o schimbare a pH-ului intestinal către latura sa acidă, facilitează absorbția calciului, probabil prin conversia sărurilor de calciu mai puțin solubile în mediu bazic, în săruri mai ușor solubile în mediu slab acid. Este posibil ca vitaminele D să schimbe pH-ul în porțiunea mijlocie a intestinului subțire, deoarece în absența vitaminelor D este redusă drastic absorbția calciului. SCHACHTER și colab. (1960), pe baza unor studii „in vitro", consideră absorbția calciului ca un proces activ care are loc împotriva unui gradient electric, dependent de metabolismul oxidativ și de influența vitaminelor D. Din contră, HARRISON și colab. (1960) este de părere că principalul efect al vitaminelor D constă în creșterea permeabilității membranelor pentru ionii de calciu. Pe de altă parte, absorbția fosforului, care departe este cea mai importantă acțiune a sărurilor de calciu, nu este direct dependentă de prezența vitaminelor D și hipofosfatemia, cel puțin la rahitici, este aparent numai consecința unei insuficiențe sau perturbări a absorbției calciului.

Scanned with OKEN Scanner

Sugarii își procură vitaminele D din laptele matern, care este mai bogat în vitamine vara, când hrana crudă este mai bogată în vitamine și provitamine D. Viteii nou născuți conțin vitamine D în proporție de 25—50% din conținutul vitaminelor D existente în sângele matern. Conținutul vitaminei D variază la animale în funcție de anotimp. Viteii conțin în sânge iarna în medie 46 UI/100 ml sânge, iar la începutul toamnei 111 UI/100 ml sânge.

De la administrarea vitaminelor D în hrană și până la depozitarea acestora în organele omului și ale animalelor se scurg perioade de timp diferite. Cele mai multe perioade se realizează la depunerea vitaminelor în ficat, timpul de înmagazinare fiind cuprins la om între 1 și 12 săptămâni. La iepuri, timpul de înmagazinare a vitaminelor D, calculat în zile, în diferite organe, se prezintă astfel: 4—7 zile în intestinul gros, 40—60 zile în plămâni și rinichi, 50—80 zile în ficat, 55—90 zile în plasmă (ENESCU, 1990).

În celule, vitaminele D se incorporează în mitocondrii, microzomi, nuclee celulare, membrane plasmatice, în proporții relativ apropiate.

În ficat, vitaminele D suferă procese de hidroxilare, esterificare, de conjugare cu glicina sau taurina, formând diferiți compuși, dintre care cei hidroxilați reprezintă formele cele mai active ale vitaminelor D.

Prin folosirea vitaminei D_2 marcate, s-a constatat că la om aceasta se depozitează mai întâi în ficat, în cantitatea cea mai mare, apoi în oase, intestin, rinichi, sânge, mușchi etc. Depozitul de vitamină D din ficat poate asigura funcționarea normală a organismului între una și 14 săptămâni.

3.8. ROL, ACTIVITATE BIOLOGICĂ, HIPO- ȘI HIPERVITAMINOZE D

3.8.1. ROLUL VITAMINELOR D ÎN PROCESE METABOLICE

Rolul biochimic specific al vitaminelor D în corpul omului și al animalelor este strâns corelat cu metabolismul calciului, al fosforului și cu procesul de osificare. În stări carențiale ale vitaminelor D, apar numeroase dereglări metabolice, dintre care cele mai caracteristice sunt apariția rahitismului la copii și osteomalacia la adulți, caracterizată prin demineralizarea și deformarea oaselor.

Dacă am clasifica efectele vitaminelor D asupra proceselor metabolice din organism, după importanță și acțiune specifică, pe primul loc ar trebui să menționăm efectul acestor vitamine asupra absorbției intestinale a calciului și a fosfaților anorganici, apoi pe locul al doilea menținerea constantă a raportului dintre conținutul calciului și al fosforului (raportul Ca/P) în sânge și în al treilea rând incorporarea sărurilor de calciu în cartilagii și în țesutul osos. Pe lângă aceste acțiuni principale, trebuie să menționăm că unele procese biologice la om și animale sunt dependente de prezența calciului, cum sunt coagularea sângelui, activitatea musculară, transportul impulsului nervos la mușchi, permeabilitatea membranelor, implicarea ionilor de calciu în metabolismul intermediar al glucidelor, lipidelor, protidelor, acizilor nucleici, a unor hormoni etc.

Scanned with OKEN Scanner

Vitaminele D intervin în absorbția calciului la nivelul intestinului subțire prin mărirea permeabilității membranelor celulare pentru acest element. Ele influențează formarea în celule a unor proteine transportoare specifice (CaBP), care fixează și transportă ionii de calciu în lichidele biologice (sânge, limfă). Se pare că în această acțiune vitaminele D intervin în procesul de transcriere a mesajului genetic de la ADN la mARN, fapt ce determină biosinteza proteinei transportoare, proces ce are loc predominant în celulele intestinale și ficat. Vitaminele D activează adenilciclaza și AMPc, necesare la biosinteza proteinelor specifice (CaBP), care fixează și transportă ionii de calciu prin membrane celulare. Ele stimulează împreună cu hormonul paratiroidian (PTH) absorbția calciului alimentar chiar și din intestinul gros.

Cercetările „in vitro" pe vilozitățile intestinale au relevat că vitaminele D stimulează transportul Ca^{2+} de la mucoasă spre seroasă și invers, iar absorbția calciului poate avea loc împotriva unui gradient de concentrație (a potențialului biochimic), fiind cuplat cu transportul Na^{+}, cu consum de energie. Inhibitorii fosforilării oxidative diminuează în mod accentuat transportul ionilor de calciu. Vitaminele D și mai ales derivații lor oxigenați stimulează absorbția intestinală a calciului și primele stadii în transportul acestui element la nivelul „bordurii în perie" a intestinului subțire.

Vitaminele D favorizează depunerea și respectiv eliminarea calciului în mitocondriile celulare, iar în citoplasmă mențin conținutul Ca^{2+} la valori normale. Aceste vitamine au de asemenea o acțiune importantă în stimularea activității osteoblastelor (celule osoase), mineralizarea oaselor prin depunerea în oase și cartilagii a fosfaților de calciu, favorizând totodată creșterea concentrației citraților și a acidului citric în lichidele interstițiale ale osului.

Vitaminele D influențează în mod substanțial metabolismul fosforului. Ele au un rol fundamental în procesul de osificare, prin transformarea fosforului organic în fosfor anorganic, favorizând astfel formarea complexului fosfocalcic din oase.

În avitaminozele D se produce o scădere a fosforului anorganic din plasmă, datorită intensificării pierderii de fosfat prin urină. Crește activitatea fosfatazei alcaline produsă de celule osteoblaste, determinând o intensificare a metabolismului osos, atât în demineralizarea oaselor (Rahitism, osteomalacie, tuberculoză osoasă), cât și în procesul invers de osificare, în refacerea fracturilor osoase.

În stări de avitaminoză D se produce o eliminare sporită a calciului prin fecale, se produce o dereglare a raportului dintre Ca/P, scade absorbția intestinală a calciului și a fosfaților. Fluctuațiile în concentrația fosfaților sunt dependente de concentrația calciului, astfel încât se consideră că fosforul trece prin intestin „legat" de calciu.

În doze normale, vitaminele D măresc activitatea fosfatazei alcaline în zonele de creștere ale oaselor (epifize), asigurând fixarea calciului și a fosforului în oase, precum și în mitocondriile din ficat, rinichi și mucoasa intestinală. Administrarea de vitamine D scade eliminarea fosfaților prin urină. Aceste vitamine activează ATP-aza din celule în special din eritrocite, cu influență favorabilă asupra formării sistemului osos, a cartilagiilor osoase și a bunei funcționări a ficatului, rinichilor și a intestinelor. În ce privește efectul vitaminelor D asupra

Scanned with OKEN Scanner

absorbției fosfaților, acesta se manifestă favorabil numai dacă este corelat cu absorbția calciului. Dacă scade absorbția intestinală a calciului, scade și cea a fosfaților. Asupra excreției fosfaților prin urină, vitaminele D au o acțiune dublă. La o concentrație normală a vitaminelor D în sânge, ele stimulează reabsorbția fosfaților în tubii urinari, însă în stări carențiale sau în hipervitaminoza D, resorbția este scăzută și se intensifică eliminarea fosfaților prin urină. Vitaminele D stimulează formarea derivaților lor oxigenați în ficat (25-)OH)-D_3) și în rinichi (1, 25-$(OH)_2$-D_3 și 24, 25-$(OH)_2$-D_3).

În stări de hipocalcemie (sub 9 mg Ca/100 ml) se produce o stimulare a secreției de parathormon, care inhibă resorbția fosfaților minerali din tubii renali, fapt ce determină la rândul său o stimulare a biosintezei 1, 25-dihidroxicolecalciferolului în rinichi, cu repercursiuni favorabile asupra absorbției intestinale a calciului și suprimarea hipocalcemiei. În stări de hipercalcemie (peste 11 mg Ca/100 ml), fenomenele se petrec invers, în sensul că este inhibată formarea metabolitului oxigenat (1, 25-$(OH)_2$-D_3), reducându-se în același timp și absorbția instestinală a calciului.

Vitaminele D inhibă funcționarea ciclului Krebs, împiedicând transformarea acidului citric în acid izocitric, sub acțiunea aconitazei, fapt ce determină acumularea acidului citric în celule și țesuturile, în care activează vitaminele D.

Efectele farmacologice ale vitaminelor D nu pot fi separate de mecanismul biochimic al proceselor metabolice la care aceste vitamine iau parte.

3.8.2. HIPOVITAMINOZE ȘI HIPERVITAMINOZE

În perioada hipovitaminozelor D, datorită unei alimentații sărace în Vitamine D, apare la copii și la animalele tinere (câini, miei, porci, pui, șobolani, șoareci etc.) maladia numită *rahitism,* caracterizată prin înmuierea și deformarea oaselor. Spre deosebire de alte tipuri de hipovitaminoze, rahitismul nu este fatal, din contră, acesta se poate menține o perioadă îndelungată, provocând deformări și desfigurări fizice, imposibilitatea copiilor de a sta în picioare, de a umbla, fiind nevoiți să se târască pe șezut, folosindu-se și de mâini.

Rahitismul se datorește unei insuficiente depozitări a fosfatului de calciu în oase și în dinți, ceeà ce influențează negativ procesul de osificare. Mai mult, se produce chiar o demineralizare a oaselor formate anterior, care devin moi și distorsionate. Primele simptome în apariția acestei boli, în stări de avitaminoză D, sunt creșterea fosfatazei alcaline, scăderea fosforului sanguin și în mai mică măsură, a calciului. În rinichi se produce o hipofosfatemie și o hipocalcemie, cu toate că uneori concentrația calciului rămâne la valori normale. Metabolismul fosforului este mai mult dereglat decât al calciului.

La copiii rahitici se produce o tulburare a mineralizării osului aflat în curs de creștere, care rezultă dintr-un dezechilibru dintre ritmul de formare al matricei osului și a cartilajului și ritmul depunerii sărurilor minerale în matricea oaselor. Datorită lipsei sărurilor de calciu, porțiunile (trabeculele) de os nou format sunt alcătuite exclusiv din substanță organică denumită osteoid. Oasele vechi se subțiază și se în-

Scanned with OKEN Scanner

moaie datorită demineralizării acestora. Aceste modificări se produc mai intens în zonele de creștere a oaselor lungi, la joncțiunea dintre cartilaj și diafiză.

Se poate concluziona că în avitaminozele D apar leziuni osoase prin scăderea absorbției intestinale a calciului și fosfaților, demineralizarea oaselor, dezechilibru între Ca/P și nemineralizarea oaselor nou formate.

Calcemia normală la copii variază între 9 și 11 mg%. În rahitism calcemia scade la valori sub 6—8 mg%. Fosfatemia normală la copii este de 5—8 mg%, iar în rahitism scade sub 3 mg%. Fosfataza alcalină din serul copiilor sănătoși are valori între 5 și 15 UI, iar în rahitism are valori foarte mari, de peste 50 UI.

Avitaminoza D se caracterizează deci printr-o scădere accentuată a capacității de retenție a Ca și P în oase, creșterea țesutului cartilaginos, iar materialul osteoid care se formează, rămâne necalcificat și astfel porțiunea osului respectiv se înmoaie. Administrarea de vitamine D la rahitici în fazele inițiale ale bolii, are efecte favorabile chiar și la 24 de ore de la începerea tratamentului. În rahitism se intensifică eliminarea fosfaților prin urină și se dereglează și raportul dintre Ca și P din sânge. Valoarea normală a raportului Ca/P este de 1 : 2 în ser și sânge. Când acest raport are valori de la 1 la 3 și chiar mai mari, se instalează rahitismul. Acțiunea vitaminelor D de a menține constant raportul Ca/P la valori normale se exercită asupra conținutului acestor elemente în sânge și în lichidele interstițiale și chiar asupra sistemului osos.

Raportul dintre Ca și P în laptele matern este de 2,2:1, iar în laptele de vacă de 1,2:1. O alimentație în care raportul Ca/P se găsește sub valori normale, sau o alimentație săracă în calciu, poate duce la rahitism. Experimental s-a demonstrat că sexul masculin este mai ușor afectat de rahitism decât cel femel, în aceleași condiții experimentale.

Rahitismul se poate datora și unor cauze secundare. Chiar dacă conținutul vitaminelor D și raportul Ca/P sunt la valori normale, dacă din cauza unor maladii (steatoree, boli pancreatice, diferite afecțiuni hepatice și renale, boala celiacă etc.) este dezechilibrată și redusă foarte mult absorbția intestinală a calciului, lipidelor și a vitaminelor liposolubile.

Concentrația ionilor de calciu și a ionilor fosfat din sânge nu depinde exclusiv de cantitatea acestor componenți absorbiți din tractul intestinal, dar în mod evident sunt influențați și de anumiți factori fizico-chimici și de unele glande endocrine. Concentrația ionilor de calciu și a ionilor de fosfat, sunt în sânge într-o relație reciprocă unul față de altul și se mențin în condiții normale la același echilibru homeostatic.

La copii rahitici, valorile acidului citric scad de la 3—5 mg% la 1—2 mg%. Este posibil ca acidul citric să formeze cu calciul în intestin, compuși mai solubili (citrați de calciu sau complecși) care sunt mai ușor absorbiți prin intestin.

Vitaminele D au un rol însemnat în reglarea eliminării Ca și P prin rinichi și fecale și prin acest mecanism contribuie și la reglarea

Scanned with OKEN Scanner

Ca și P sanguin. Eliminarea continuă a Ca și P prin rinichi și fecale determină o micșorare a conținutului acestora în sânge. Dar această pierdere a celor două elemente este compensată de intensificarea absorbției intestinale a acestora sub acțiunea vitaminelor D.

În acest proces poate interveni și hormonul paratiroidian. Sub acțiunea crescută a Ca din sânge, ca urmare a absorbției intestinale intensificate, sub acțiunea vitaminelor D, se produce o scădere a hormonului paratiroidian, fapt ce va avea efect micșorarea eliminării P prin urină. Hormonul paratiroidian stimulează eliminarea fosfaților prin urină, dar prin hiposecreția sa, scade implicit eliminarea fosforului. In stări carențiale ale vitaminelor D, acest proces nu are loc, fapt ce determină apariția hipocalcemiei, ce va determina o intensificare a glandelor paratiroide și implicit eliminarea accentuată a fosfaților prin urină și scăderea conținutului acestora din ser. În rahitism, apariția hipofosfatemiei este o trăsătură caracteristică a acestei maladii. Conținutul calciului nu întotdeauna are un nivel scăzut în sânge, datorită absorbției intestinale reduse în hipovitaminoză, datorită trecerii acestuia din oase în sânge, sub acțiunea indirectă a glandelor paratiroide, astfel încât calcemia se poate menține la valori apropiate de cele normale. S-au semnalat cazuri de rahitism în care calcemia este la valori normale, dar fosfatemia este mult scăzută. Eliberarea acidului fosforic din numeroșii săi esteri (fosfoglucide, nucleotide, fosfolipide etc.), se face sub acțiunea fosfatazelor, pe cale hidrolitică. Acidul fosforic astfel pus în libertate, se unește cu ionii de calciu din ser și formează fosfatul de calciu, care se depune în oase. Vitaminele D stimulează activitatea fosfatazelor sanguine. În rahitism, fosfatazele osoase determină o eliminare masivă a fosforului din oase și eliminarea fosfaților prin urină.

Un alt hormon care joacă un anumit rol în metabolismul calciului este *tirocalcitonina,* secretată de glandele tiroide, care inhibă eliminarea calciului din oase și astfel determină un efect hipocalcic.

Pentru apariția rahitismului experimental se impune o alimentație lipsită de vitamine D, un regim rahitogen, în care raportul Ca/P să fie de 5 : 1.

Osteomalacia este o afecțiune care apare în stări de hipovitaminoză D la oamenii adulți și mai cu seamă la bătrâni. Ea se caracterizează printr-o decalcifiere și deformare a oaselor, micșorarea lor în volum. Apare și osteoporoza, caracterizată prin rarefierea țesutului osos. In tratarea osteomalaciei, pe lângă alte măsuri care se iau, trebuie să se dea vitamine D în amestec cu săruri de calciu și fosfați.

Tetania este de asemenea o afecțiune care apare în stări carențiale ale vitaminelor D și se datorește scăderii conținutului Ca^{2+} din sânge sub valorile normale. În tetania hipoparatiroidiană are loc o micșorare masivă a conținutului Ca^{2+} din sânge. Tetania este însoțită de o hiperiritabilitate a sistemului nervos, spasmofilii și se tratează prin administrarea de gluconat de calciu.

În stări carențiale de vitamina D se produc și dereglări la nivelul dinților la copii cu menținerea dinților de lapte și degradarea emailului dentar. În cazuri mai grave de rahitism este afectat nu numai scheletul, ci și sistemul muscular, țesuturile de legătură, cartilagiile și tendoanele. Se atrofiază musculatura tubului gastrointestinal. Cu toate că rahitismul nu este o maladie mortală, deformarea și subțierea oaselor,

Scanned with OKEN Scanner

precum și dereglarea emailului dentar, dacă nu sunt tratate la începutul bolii, după mai multe luni de suferință devin procese ireversibile.

În practica medicală, vitaminele D sunt utlizate în prevenirea și tratarea rahitismului, iar mai recent se folosesc și în terapia hipoparatiroidismului și a osteomalaciei. Pentru copii, tratamentul cu vitamine D trebuie să fie însoțit și de expunerea acestora la soare, în perioadele cu zile însorite ale anului.

În scopuri profilactice, copii care nu sunt expuși la soare, trebuie tratați zilnic cu doze de 500—1 000 UI de vitamina D. Sunt posibile și administrarea unor doze mai mari deoarece corpul poate să depoziteze în ficat, mușchi, rinichi și în alte organe vitamine D, iar o parte să le transforme în compuși hidroxilați. În aceste cazuri se poate administra o singură doză de 10—15 mg, oral sau intramuscular.

Această doză de aproximativ 400 000 UI de vitamina D poate proteja copiii mici de rahitism o perioadă de 4 la 7 luni. Este totuși recomandabil să se administreze doze mici pe perioade mai îndelungate. Dozele mari de vitamine pot da reacții inverse, dacă sunt administrate o perioadă mai îndelungată.

Terapia rahitismului mediu la copiii mici necesită doze zilnice de 5 000 UI vitamine D, iar în rahitismul sever, doze de 10 000 UI.

Pentru a evita apariția spasmofiliilor, datorită unei fixări rapide a calciului în oase și deci o scădere bruscă a concentrației ionilor de calciu din sânge, terapia cu vitamine D trebuie să fie însoțită de o suplimentare orală cu săruri de calciu solubile. În cazuri acute, calciul se va da prin injecții.

În hipoparatiroidism, dozele mari de vitamine D stimulează fosfaturia, cu o creștere a concentrației ionilor de calciu în ser la valori normale.

Unele afecțiuni corelate cu acțiunea vitaminelor D sunt determinate genetic și se moștenesc. Așa este *Sindromul Fanconi,* care se caracterizează prin depunerea de cisteină în țesuturi, sau unele afecțiuni privind resorbția fosfaților la nivelul rinichilor.

Corelația dintre metabolismul lipidelor și cel al vitaminelor D se observă bine în procesul de absorbție, întrucât absorbția provitaminelor D și a vitaminelor necesită prezența unui nivel optim de lipide alimentare. Modificări în conținutul lipidelor sub valoarea normală, pot determina diminuarea absorbției vitaminelor D și implicit apariția rahitismului și a altor afecțiuni metabolice.

În privința corelației cu glucidele, se menționează că lactoza stimulează absorbția și retenția Ca^{2+}, Mg^{2+}. a fosfaților și favorizează osificarea, iar pe de o parte, în rahitism fosforilarea glucidelor este mult inhibată. Se apreciază că razele UV au efecte similare insulinei.

Hipervitaminoza D. Prin utilizarea unei hrane bogate în vitamine D (ulei de ficat de pește, drojdii iradiate, ficat de baton, midii, stridii, unt iradiat, gălbenușuri de ouă etc.) se instalează starea de hipervitaminoză D, care se caracterizează prin tulburări gastrice, poliurie, anorexie, scăderea în greutate, inflamație renală etc. Crește conținutul calciului sanguin la peste 17 mg%, ceea ce duce la calcifierea unor țesuturi moi, a arterelor renale și a aortei, apariția calculilor renali etc. Crește concentrația citratului sanguin de la 3—4% la oamenii sănătoși la peste 6 mg%. Experimental, hipervitaminoza D se poate pro-

Scanned with OKEN Scanner

duce la omul adult prin administrarea zilnică a 150 000—200 000 UI de vitamină D.

Experimentele pentru producerea hipervitaminozei D s-au făcut cu vitamine D_2 și D_3 sintetice pe diferite animale și s-a remarcat că toleranța față de dozajul vitaminelor D depinde mult și de natura speciilor. Astfel s-a remarcat că bibilicile, câinii și șobolanii dau semne de intoxicare la doze mari de vitamine D, iar iepurii și pisicile la doze mai mici, în comparație cu copiii.

Modul de administrare a vitaminelor este de asemenea un criteriu important, corelat cu procesul de absorbție. De exemplu la șobolani, doza orală zilnică de 46 000 UI/kg corp greutate, continuată până se administrează prin cumulare, 2 500 000 UI/kg corp greutate, determină o mortalitate de 100%, pe când aceiași doză zilnică administrată intramuscular, poate fi continuată până se ajunge la un dozaj total de 3 700 000 UI/kg corp greutate, fără să cauzeze moartea animalelor.

Numeroși cercetători au semnalat că vitaminele D sintetice, oricât ar fi de pure, administrate în doze mari sunt toxice pentru om. S-au semnalat cazuri mortale la copii care au consumat cantități mari de ulei de pește și au făcut plajă îndelungată la soare. De asemenea unii bolnavi care au primit doze mari de vitamină D (100 000—150 000 UI/zi) pentru vindecarea maladiei de piele „lupulus vulgaris" au prezentat fenomene toxice. *D. Debre* (citat de ENESCU, 1990) menționează că din 31 de copii cu hipervitaminoză acută, 12 au murit. S-a constatat de asemenea că vitamina D administrată per os, în soluție uleioasă este mai puțin toxică decât vitamina D în soluție alcoolică. Dozele de 20 000—50 000 UI/zi administrate la sugari devin toxice, dacă sunt administrate mai multe săptămâni, determinând apariția durerilor de cap, transpirații abundente, cu sensibilitatea acută a scaunului.

În stări de hipercalcemie apar leziuni renale, cu blocarea secreției hormonului paratiroidian. Moartea poate surveni prin uremie, hemoragie, tulburări cardiace, leziuni endoteliale coronariene, modificarea echilibrului Mg^{2+}/Ca^{2+}, care determină calcifierea unor țesuturi moi. Activitatea fosfatazei alcaline este mult redusă și poate să apară hipertensiune arterială. Se produce de asemenea o demineralizare a oaselor, cu depozite de calculi în rinichi, ficat, vase de sânge, stomac, creier etc. Apar manifestări similare cu cele din hiperparatiroidism sau din sindromul hipercalcic.

Dintre simptomele clinice care apar în stări de hipervitaminoză prelungită, mai menționăm apariția în faza incipientă de grețuri, inapetență, poliurie cu deshidratări, vărsături, apoi în faze mai înaintate apar constipații puternice, creșterea uremiei prin insuficiență renală, astenie intensă, somnolență și chiar anurie.

La șoareci, șobolani, iepuri, câini, pisici, maimuțe, ca de altfel și la om, hrana excesiv de bogată în vitamine D determină apariția hipercalcemiei, însoțită de obicei de hiperfosfatemie și de o slabă reducere a activității fosfatazei alcaline, iar pH-ul sângelui arterial poate să crească la 7,8, reflectând o stare de alcaloză sistemică. Depozite de calciu sub formă de $CaCO_3$ și $Ca_3(PO_4)_2$ (calculi) se depun în rinichi, miocard, artere, glande paratiroide, alveole pulmonare, pancreas și stomac. Cel mai mult afectați sunt rinichii și de cele mai multe ori moartea survine prin uremie, în cazul intoxicațiilor cu vitamine D.

Scanned with OKEN Scanner

Dozele toxice pentru oamenii adulți sunt de aproximativ 100 000 UI/zi date 1—2 luni, iar pentru copii între 20 000 și 40 000 UI/zi. Semnele tipice în cazul calciunefrozei constau în creșterea azotului ureic în sânge, albuminurie, hematourile și abundența de calculi renali. Așa după cum s-a menționat, uremia în cele mai multe cazuri este fatală.

În tratamentele curative a hipervitaminozelor se recomandă oprirea administrării de vitamine D, hrană săracă în aceste vitamine, iar la sugari se impune administrarea intravenos de ser fiziologic, deoarece una din cauzele morții este pierderea din organism a electroliților. Se va da bolnavilor să bea multă apă, ceaiuri și regim alimentar sărac în săruri de calciu, iar în cazuri mai grave se vor face tratamente cu hidrocortizon.

3.8.3. INTERRELAȚIILE VITAMINELOR D CU ALTE VITAMINE, HORMONI ȘI ȚESUTURI

Prin experiențe făcute pe șobolani s-a constatat că tratamentele cu doze mari de vitamina A diminuează efectul vitaminelor D în tratarea rahitismului, determinând o fragilitate și demineralizare a oaselor. Există un antagonism între acțiunea vitaminelor A și consecințele hipervitaminozelor D datorită faptului că dozele mari de vitamină A interferează cu efectul osteolitic al vitaminelor D. La concentrații optime, vitaminele A și D au o acțiune sinergică.

Vitaminele D, împreună cu vitaminele K, stimulează biosinteza proteinei osoase necolagene, denumită *osteocalcina,* care reprezintă 15—20% din totalul proteinelor osoase.

Vitaminele D participă alături de parathormon la reglarea metabolismului fosforului și calciului, dar prin mecanisme diferite.

Parathormonul intensifică fosfaturia, care influențează scăderea fosfaților serici, ca urmare a acestor procese se produce delocalizarea calciului și fosforului din oase, precum și o intensificare a resorbției calciului din tubul digestiv (intestine) și trecerea lui din celulele mucoasei intestinale în sânge, fapt ce va determina o hipercalcemie cu hipofosfatemie, întrucât eliminarea prin urină a fosfaților este mai intensă decât a calciului.

În hipovitaminoză D se intensifică secreția parathormonului, care stimulează hidroxilarea compusului 25-OH-D_2 în 1, 25-$(OH)_2$-D_3, care va determina o absorbție mai intensă a ionilor de calciu din intestin. De asemenea, nivelul calciului din sânge reglează formarea în ficat a derivatului oxigenat 25-OH-D_3 și oxidarea acestuia în rinichi la 1, 25-$(OH)_2$-D_3.

Prin cercetări mai noi s-a arătat că prin hidroxilări și prin fixarea fluorului pe molecula vitaminelor D se obțin compuși foarte activi, nu numai cu efect asupra calciului și fosforului, ci și asupra altor electroliți, în special a magneziului și zincului.

Hormonii corticoizi influențează activitatea vitaminelor D în ce privește metabolismul calciului. Hormonii estrogeni au o activitate sinergică cu a vitaminelor D, influențând favorabil procesele de calcificare a oaselor, în timp ce hormonii androgeni au o acțiune inversă rahitogenă.

Scanned with OKEN Scanner

În carența vitaminelor D, mușchii scheletici își pierd tonicitatea, fiind afectată mai intens și musculatura netedă, cu repercursiuni în ce privește scăderea tranzitului alimentar, alterarea florei intestinale și a unor procese metabolice la nivelul intestinelor. Scăderea hipocalcemiei determină tulburări și la nivelul sistemului nervos, în special la copii, caracterizate prin iritabilitate, tresăriri, tetanie, spasmele glotei, cu sufocări și oprirea scurtă a respirației.

În rahitism se produce o scădere a metabolismului bazal, datorită hiposecreției hipofizei și tiroidei, precum și absorbției deficitare a fierului, ce va determina anemie.

Acțiunea antiinfecțioasă a vitaminelor D se apreciază datorită frecvenței mari a infecțiilor intestinale la copiii rahitici și scăderea rezistenței șobolanilor carențați față de virusul gripal, precum și prin scăderea rezistenței maimuțelor rahitice la acțiunea virusului poliomielitei.

Dintre formele biologice active ale vitaminei D_3 obținute prin sinteză, care se găsește în farmacii, menționăm *calcitriolul,* care este cel mai activ și mai important metabolit al calciferolului. Acesta se formează în rinichi prin precursorul său 25-hidroxicolecalciferol. Calcitriolul stimulează absorbția intestinală a calciului și regularizează mineralizarea oaselor. Este folosit și în tratamentul afecțiunilor renale grave (hemoliză).

Un alt preparat farmaceutic este *rocaltrolul,* care este utilizat în tratamentul osteodistrofiilor renale, normalizarea hipocalcemiei și a fosfatazei alcaline, la reducerea durerilor musculare, normalizarea concentrației parathormonului în sânge.

3.9. REPREZENTANȚI AI VITAMINELOR D

În acest subcapitol se vor prezenta succint structura și proprietățile vitaminelor D.

Vitamina D_1 este un amestec echimolecular al vitaminei D_2 cu lumisterolul. Această vitamină nu este un compus monomolecular și nu s-a identificat ca și compus unitar. Ar putea fi un produs de adiție al vitaminei D_2 cu lumisterolul (sau simplu amestec), care se formează în cursul iradierii ergosterolului cu radiații UV. La această „structura" s-a ajuns pe baza diagramei punctelor de fuziune a amestecurilor în proporții diferite ale celor doi componenți. Prin hidrogenarea calciferolului cu seleniu se obține un amestec de ergosterol cu lumisterol.

Vitamina D_2 este numită ergocalciferol sau simplu calciferol. Structura moleculară a vitaminei D_2 se prezintă în figura 3.8. Este o substanță organică ternară cu formula moleculară $C_{28}H_{44}O$. Din punct de vedere chimic este un izomer al ergosterolului, care îndeplinește rolul de provitamină D_2. Se formează în piele prin iradierea ergosterolului cu lumină ultravioletă, având optimul de eficacitate la acțiunea radiațiilor cu lungime de undă de 280 nm.

Conține trei duble legături conjugate în nucleul B deschis și o dublă legătură pe catena laterală, între atomii de carbon C-22 — C-23.

Scanned with OKEN Scanner

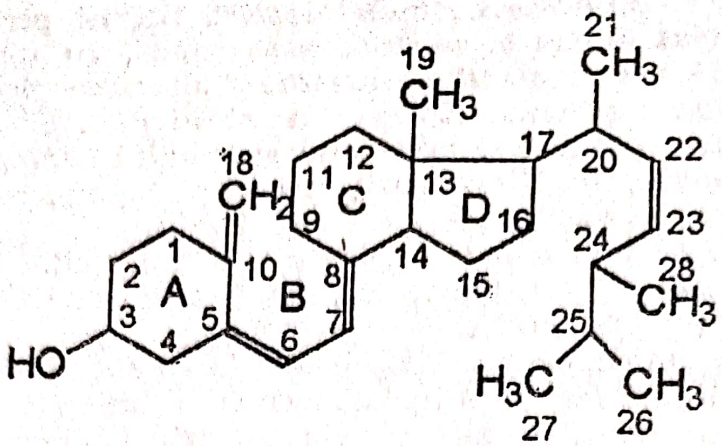


Fig. 3.8. Structura moleculară a vitaminei D_2

La C-3 are o grupare hidroxilică liberă, iar la C-24 are fixat un metil. Catena laterală conține nouă atomi de carbon.

Este o substanță solidă, formează cristale aciculare sau prismatice (în funcție de solvent), cu puncte de topire cuprinse între 114,5—117°C. Este insolubilă în apă, dar solubilă în eter etilic, acetonă, eter de petrol, benzen, cloroform, în grăsimi și uleiuri. Este relativ stabilă la încălzire, la temperaturi în jur de 100°C, și la acțiunea oxigenului. La temperatura de 180°C, timp de 4 ore, își pierde ireversibil activitatea vitaminică, distrugându-se. Este mai stabilă în mediu bazic decât în mediu acid. Este optic activă și nu reacționează cu digitonina (ca de altfel toate vitaminele D), reacție prin care se deosebește de ergosterol. Deviază planul luminii polarizate cu (+) 102° în soluție alcoolică și cu (+) 152° în cloroform. Pe cale industrială se obține prin iradierea ergosterolului cu o lampă de mercur cu lumină ultravioletă, la lungimea de undă de 280 nm. Transformarea ergosterolului în vitamina D_2 atât „in vivo" cât și „in vitro" explică importanța helioterapiei și de ce trebuiesc expuși copiii rahitici acțiunii radiațiilor ultraviolete. Soluția uleioasă emulsionată în apă, pierde 50% din activitate după 3 săptămâni, iar după 6 luni, aproximativ 80%. Prin răcire la 0°C, o soluție uleioasă pierde 50% din activitate după 3 ani. Vitamina D_2 se distruge uscr în mediu puternic acid, cu aldehida formică și apa oxigenată.

Vitamina D_3, numită și colecalciferol, are formula moleculară $C_{27}H_{44}O$), iar formula structurală se prezintă în figura 3.9.

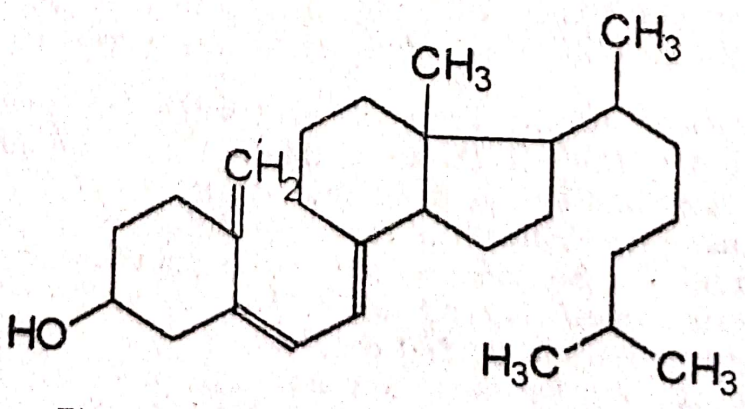


Fig. 3.9. Structura moleculară a vitaminei D_3

Scanned with OKEN Scanner

Se formează în piele și țesutul subcutanat din 7-dehidrocolesterol (care îndeplinește rolul de provitamina D_3) sub acțiunea radiațiilor ultraviolete. Această provitamina D se poate forma atât prin dehidrogenarea colesterolului sub acțiunea radiațiilor luminoase, cât și la nivelul intestinului subțire, sub acțiunea 7-colesteroldehidrogenazei. Indiferent de proveniența sa, 7-dehidrocolesterolul se transformă în vitamina D_3 într-o proporție covârșitoare sub acțiunea razelor UV, iar într-o proporție foarte redusă și sub acțiunea radiațiilor mitogenetice.

Spre deosebire de calciferol, vitamina D_3 are o catenă laterală saturată, formată din C_8, fără o legătură dublă și fără metil la C-24. Restul elementelor structurale sunt identice cu ale vitaminei D_2.

Are proprietăți fizice și chimice similare cu ale calciferolului. Se prezintă sub formă de cristale incolore sau pulbere albă. Nu are miros sau gust. Este insolubilă în apă, dar este solubilă în solvenții grăsimilor. În mediu alcalin sau acid se comportă similar vitaminei D_2. Este mai activă la om decât vitamina D_2. La om se găsește atât în stare liberă cât și sub formă de provitamină.

La animalele de fermă vitaminele D_2 și D_3 au aceeași putere biologică. La păsări vitamina D_2 prezintă o slabă activitate antirahitică.

Cristalizează bine din soluție, iar cristalele au punct de topire la 82—84°C. Prezintă activitate optică dextrogiră, având unghiul de rotație a luminii polarizate la (+) 89° în acetonă. În stare liberă vitamina D_3 se găsește în cantitate mai mare în untura de pește, carnea de heringi și sardele, în ficatul peștilor și al mamiferelor etc. Majoritatea autorilor consideră colecalciferolul ca adevărata vitamină D, cu cea mai mare răspândire și activitate biologică.

Se obține pe cale industrială prin iradierea 7-dehidrocolesterolului cu raze ultraviolete la lungimea de undă de 286 nm. Se degradează repede sub acțiunea luminii și a aerului. Prin încălzire se izomerizează în precalciferol, care prezintă numai 35% activitate vitaminică, din valoarea colecalciferolului.

Vitamina D_4 este denumită și 22-dihidrocalciferol. Formula structurală a acestei vitamine se prezintă în figura 3.10. Formula moleculară conține $C_{28}H_{46}O$. Sub aspect structural, se deosebește de vitamina D_2 prin lipsa dublei legături dintre atomii C-22 — C-23. Are ca provitamină 7-dehidroergosterolul.

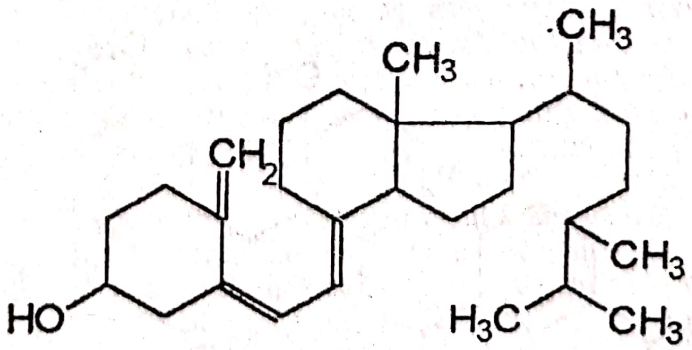


Fig. 3.10. Structura moleculară a vitaminei D_4

Scanned with OKEN Scanner

Vitamina D_4 nu se găsește în natură, în plante sau animale. Ea se formează prin iradierea 22-dehidroergosterolului. Se prezintă sub formă de cristale cu punct de topire la 89,3°C. Are o activitate vitaminică mai mică decât a vitaminelor D_2 și D_3.

Vitamina D_5 este denumită și sitocalciferol. Formula structurală se prezintă în figura 3.11, iar formula moleculară brută conține $C_{29}H_{48}O$. Catena laterală conține la C-24 un etil și nu conține o dublă legătură. Provine din fitosteroli cu C_{29}. Are ca provitamină 7-dehidrocolesterolul, din care se formează prin iradiere cu radiații UV. Este slab răspândită în natură. Se prezintă sub formă de cristale cu punct de topire la 144—145°C. Prezintă activitate optică levogiră în cloroform, cu valoarea unghiului de rotație a luminii polarizate de (—) 116°. Prezintă un maxim de absorbție la 265 nm în UV. Activitatea sa vitaminică este aproximativ de 30 de ori mai slabă decât ceea a calciferolului.

Vitamina D_6 se numește și stigmacalciferol. Se formează prin iradierea 7-dehidrostigmasterolului. Se deosebește de vitamina D_5 prin prezența unei duble legături între atomii C-22 — C-25. La C-24 are fixat un radical etil. Are formula moleculară $C_{29}H_{46}O$, iar cea structurală se prezintă în figura 3.12.

Prezintă un maxim de absorbție la 265 nm în UV. Se obține în stare solidă, cristalină, cu punct de topire la 154°C, cu activitate optică levogiră, având unghiul de rotație a luminii polarizate la (—) 113,15° în benzen.

Vitamina D_7 sau cetona 250_3 are formula structurală prezentată în figura 3.13. Este formată din $C_{28}H_{46}O$. Are mai multă importanță teoretică decât terapeutică. Se obține prin iradierea 7-dehidrocampestro-

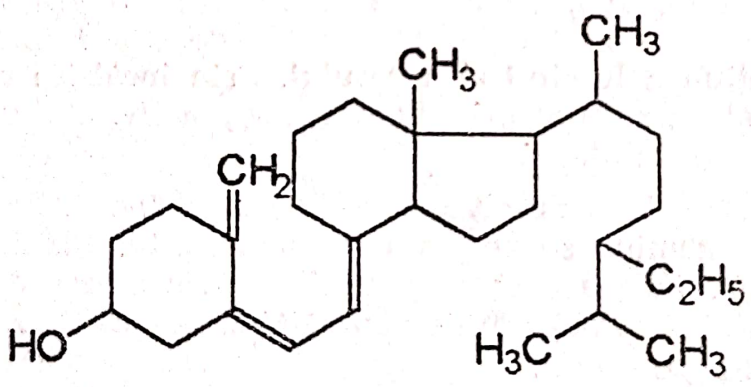


Fig. 3.11. Structura moleculară a vitaminei D_5.

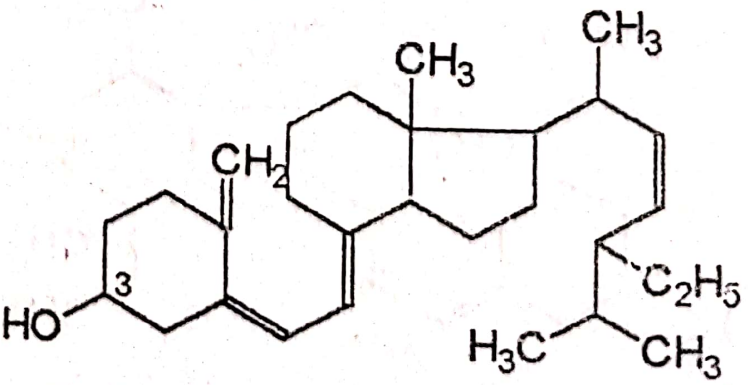


Fig. 3.12. Structura moleculară a vitaminei D_6.

Scanned with OKEN Scanner

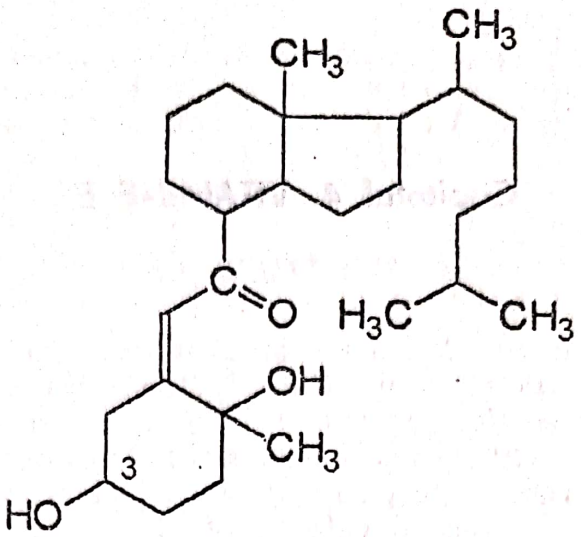


Fig. 3.13. Structura moleculară a vitaminei D_7

lului, care îndeplinește rolul de provitamină. Sub acțiunea radiațiilor UV această provitamină se transformă în vitamina D_7. Este înrudită structural cu vitamina D_3, prezintă o grupare cetonică și un maxim de absorbție la 250 nm, fapt pentru care se mai numește și „cetona 250_3", indicele trei arătând înrudirea cu vitamina D_3.

Se poate obține și din colesterină prin tratare cu Al_2O_3 în mediu alcalin și prin iradierea 2,4,2',4' -bicolestandienei și din produsele care rezultă din tratarea colesterolului cu acidul sulfuric sau cu clorura de acetil. Se găsește în cantitate mare în uleiul din ficatul unor pești marini și în unele graminee. Are o putere vitaminică de 10 ori mai mică decât a vitaminei D_3. Vitamina D_7 se separă cu ușurință de vitamina D_3 prin cromatografie pe hârtie sau pe strat subțire, având o deplasare mai mică pe adsorbant (Rf mic).

3.10. ANTIVITAMINE D

Antivitaminele au o acțiune rahitogenă, împiedicând absorbția și depunerea calciului în oase, chiar dacă nu s-a instalat carența în vitamine D. Dintre aceste substanțe rahitogene face parte acidul fitic și fitina (hexafosfatul de calciu și magneziu al mezoinozitolului) care se găsește în tărâțele cerealelor, în plantele leguminoase etc. Spanacul, datorită conținutului ridicat în acid oxalic, prezintă acțiune rahitogenă.

În frunzele de ovăz s-au pus în evidență existența unor compuși steroidici cu acțiune antivitaminică D. Cortizonul și acetatul de cortizon în tratamente mai îndelungate determină apariția unor simptome

Dintre substanțele antibiotice, puromicina, actinomicina și mitraminina au acțiune rahitogenă. Ele inhibă biosinteza proteinei specifice (CaBP), care leagă și transportă ionii de calciu.

Absorbția vitaminelor D este diminuată sensibil și sub acțiunea fenobarbitalului, hidroxidului de aluminiu, vitaminelor B_1 și B_{12}, cisteinei, uleiului de vazelină administrat per os, precum și de ionii SO_4^{2-}, Mg^{2+} etc.

Prin antivitamine D se înțelege capacitatea unor substanțe de a produce rahitism la aport normal de vitamine D.

Scanned with OKEN Scanner

Capitolul 4. VITAMINE E

4.1. Scurt istoric 99
4.2. Structură chimică și activitate biologică 100
4.3. Proprietăți fizice și chimice, reprezentanți 104
4.3.1. Proprietăți fizice și chimice 104
4.3.2. Reprezentanți 106
4.4. Metode de identificare și dozare 109
4.5. Răspândire în natură 113
4.6. Absorbție, transport și necesități 116
4.7. Rol și acțiune biologică 119
4.7.1. Efectul antioxigen 120
4.7.2. Rolul tocoferolilor în oxidările celulare 121
47.3. Rolul tocoferolilor în metabolismul țesutului muscular 122
4.7.4. Rolul tocoferolilor asupra eritrocitelor 123
4.7.5. Rolul tocoferolilor în metabolismul intermediar 124
4.7.6. Interacțiunea tocoferolilor cu alte vitamine și enzime 124
4.8. Hipo- și hipervitaminoze E 125
4.9. Antivitamine E 128
4.10. Tratamente cu tocoferoli 128

Vitaminele E se mai numesc și *tocoferoli* (tokos = progenitură, ferein = a naște), *vitaminele antisterilității* sau *vitamine de fecunditate*. Ele sunt biosintetizate numai în organismele vegetale, în special în frunze, muguri, semințe în stare de germinație, polen. Omul și animalele își procură aceste vitamine din hrană.

Vitaminele E se mai numesc și vitaminele antisterilității, deoarece intervin în procesul de fertilitate, stimulând la masculi formarea spermatozoizilor, iar la femele intensifică procesul de gestație. Sunt utilizate în tratamente profilactice și curative pentru combaterea sterilității la organismele animale, fapt pentru care se mai numesc *vitamine de fertilitate, vitaminele fecundității* sau *vitamine de reproducere*.

Au un caracter antioxidant pronunțat, protejând de degradări oxidative diferite substanțe biologic active, cum sunt vitaminele A, D, F, acizii grași nesaturați, diferiți pigmenți, hormoni, eritrocite, enzime etc.

Scanned with OKEN Scanner

Influențează activitatea unor țesuturi și organe, a unor glande endocrine, a eritrocitelor, a sistemului muscular și nervos, iau parte în numeroase procese metabolice, având un rol activ în organismele vegetale și animale.

4.1. SCURT ISTORIC

Prima semnalare asupra unor deficiențe în reproducere, datorită hranei utilizate, a fcst făcută în 1920 de către *H. A. Mattiel* și *R. E. Conchin,* care au remarcat că șobolancele hrănite numai cu lapte se dezvoltă bine, dar prezintă tulburări de reproducere.

În 1922, *H. M. Evans, K. S. Bishop* și *H. McLean* au semnalat prezența unui factor alimentar liposolubil important pentru fecunditatea animalelor. Ei au stabilit că șobolanii albi hrăniți numai cu cazeină, amidon, grăsime de porc, unt de vacă, drojdie de bere și săruri minerale se îmbolnăvesc. La masculi, s-a remarcat o degenerare a spermatozoilor, pierderea capacității de fecundare, atrofierea tubilor seminiferi și instalarea unei sterilități permanente. La femele ciclul estral, producerea ovulelor și fecundarea decurg normal, dar fixarea ovulului se face cu greutate, fătul moare și este resorbit. Prin adăugarea de frunze verzi, plantule sau semințe germinate de cereale, sunt îndepărtate dereglările care apar în procesul fecundației. Factorul existent în hrană care influențează procesul de reproducere este liposolubil și insaponificabil.

În 1924, *B. Sure* confirmă cercetările efectuate de *M. Evans* și colab., din 1922 și atribuie factorului liposolubil care influențează fecunditatea la animale, numele de *vitamina E.* I s-a atribuit numele de vitamina E întrucât până la acea dată se cunoșteau numai vitaminele A, B, C și D. Inițial se credea că această vitamină este necesară pentru formarea spermatozoizilor la masculi, iar pentru femele, spre a duce gestația la termen. Ulterior s-au stabilit și alte acțiuni ale acestei vitamine, inclusiv caracterul său antioxidant.

În 1927, *M. Evans* și *I. Burr,* pe baza mai multor experiențe pe șobolance, arată că animalele care nu primeau în hrană în timpul gestației, semințe germinate sau frunze verzi de salată, nu puteau purta sarcina până la termen, producându-se frecvent decesul fătului și resorbția acestuia.

Până în 1928 se considera că vitamina E (factorul liposolubil, factor x, tocoferol) are rol biologic numai în procesul de reproducere, respectiv în formarea celulelor germinative, fecundație și gestație. Tot experimental s-a stabilit că puii de șobolan proveniți de la mame cu deficit de vitamina E, paralizau. *M. Goetsch* și *M. Pappenheimer* au semnalat în 1931 că la iepurii de casă și cobaii cu carență de vitamină E apare o distrofie musculară primară similară cu distrofia musculară la om, în stare de hipovitaminoză E. Ulterior s-au publicat mai multe lucrări științifice cu rezultate experimentale privind efectul vitaminei E asupra sistemului nervos în tratatarea unor femei cu avorturi repetate, în tratamentul distrofiei musculare și al degenerării neurologice (ENESCU, 1990).

Scanned with OKEN Scanner

M. Evans și *G. Emerson* au reușit în 1936 să izoleze din uleiul obținut din germeni de grâu, prin tratare cu acid cianhidric, doi alcooli tocoferolici, α- și β-tocoferol, iar din semințe de bumbac γ-tocoferolul. Sinteza acestor trei tocoferoli (α, β și γ) a fost realizată în 1938 de către *Paul Karrer* din Elveția. În uleiul obținut din boabe de soia s-a descoperit în 1946 δ-tocoferol de de către *J. Green* și colab., iar în 1956 *H. Eggit* și *F. Norris* au identificat în nutreț vegetal ε -tocoferolul. Tot în același an s-a identificat în orez și η-tocoferol, de către *J. Green* și *S. Marcinkiewiez.*

În 1960, Uniunea Internațională de Chimie Pură și Aplicată (IUPAC) a schimba denumirea vitaminei E cu cea de tocoferol și a stabilit că valoarea unei unități internaționale (UI) este echivalentă cu a unui miligram de acetat de dl-α-tocoferol (1 UI = 1 mg dl-α-tocoferol), sau cu 0,73 mg de d-α-tocoferol acetat sau cu 0,81 mg α-tocoferol. S-a stabilit de asemenea că 1 mg de acetat de α-tocoferol sintetic corespunde ca activitate vitaminică la 0,911 mg α-tocoferol natural.

În trecut se folosea pentru exprimarea acțiunii biologice a vitaminei E și Unitatea Șobolan (US), care reprezenta doza minimă de vitamina E ce se administra zilnic „per os" la femelele de șobolan carențate pentru îndepărtarea fenomenelor caracteristice avitaminozei E. Unitatea șobolan are același efect specific ca și 2 mg de α-tocoferol natural.

4.2. STRUCTURĂ CHIMICĂ ȘI ACTIVITATE BIOLOGICĂ

Tocoferolii derivă de la o structură de bază comună, numită de P. Karrer „tocol", care este formată dintr-un nucleu cromanic ce conține la C-6 o grupare hidroxil și la C-2 un radical metil și o catenă laterală saturată, derivată din fitol, având 12 atomi de carbon liniari și patru radicali metili situați câte unul la C-4' C-8', iar doi la C-12' (figura 4.1).

Cromanul este format dintr-un ciclu benzenic condensat cu un heterociclu piranic, care conține oxigenul heterociclic în poziție para, iar la C-2 al heterociclului este substituită o catenă laterală saturată, analogă fitolului și un radical metil (figura 4.2).

Fitolul este un alcool alifatic nesaturat care se găsește în cantitate mare în cloroplaste, unde se găsește sub formă de ester al clorofilelor. Gruparea hidroxilică fenolică s-a identificat pe baza spectrului

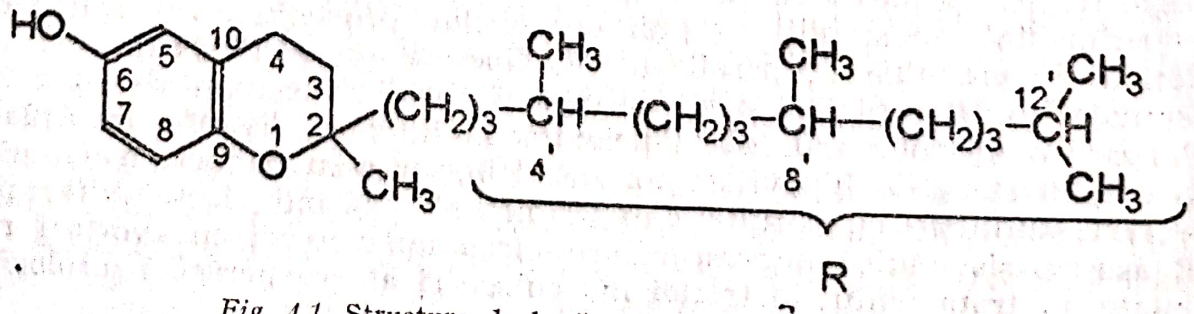


Fig. 4.1. Structura de bază a tocolilor (tocoferolilor)

Scanned with OKEN Scanner

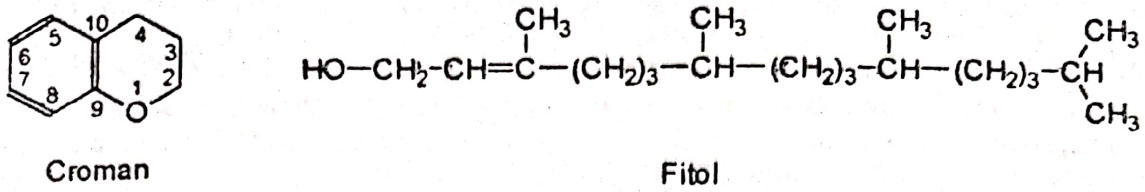


Fig. 4.2. Structura cromanului și a fitolului

de absorbție caracteristic și prin proprietatea sa de-a trece prin oxidare, în cetonă. Reacția este reversibilă, fapt ce permite tocoferolilor să îndeplinească și rolul de transportori neenzimatici de hidrogen.

Principalul tocoferol, atât în ce privește activitatea biologică cât și răspândirea în natură, este α-tocoferolul, a cărui formulă structurală se prezintă în figura 4.3.

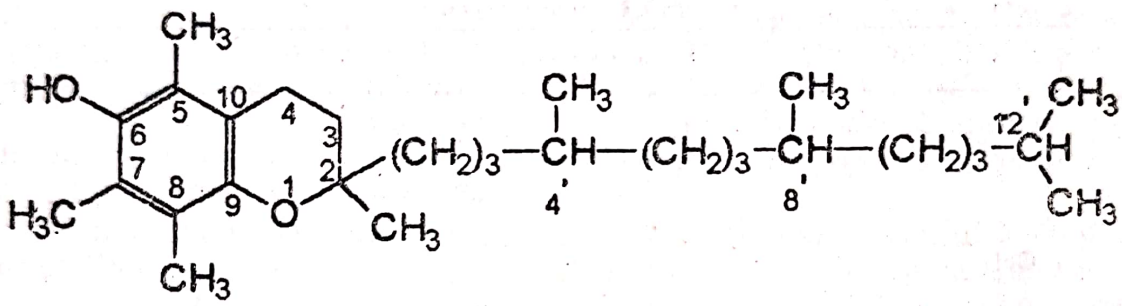


Fig. 4.3. Structura moleculară a α-tocoferolului

Din structura de bază denumită „tocol" derivă toți tocoferolii, care se deosebesc între ei sub aspect structural, atât prin numărul și poziția grupărilor metil substituite în ciclul cromanic, cât și prin prezența sau absența unor duble legături în catena laterală. Toți tocoferolii conțin la C-6 din nucleul benzenic o grupare hidroxil (OH), care le determină caracterul fenolic, iar la C-12 din nucleul heterociclic au un radical metil și catenă laterală specifică, care la principalii tocoferoli este identică. Numerotarea atomilor începe de la atomul de oxigen heterociclic, cu cifre simple în nucleul cromanic și cu cifre prim, în catena laterală.

Până în prezent s-au identificat în natură și s-au sintetizat 7 tocoferoli, notați cu următoarele litere din alfabetul grecesc: α, β, γ, δ, ε , ξ, η-tocoferoli. Denumirea și poziția radicalilor metilici substituiți pe nucleul cromanic se prezintă în tabelul 4.1., iar structura moleculară simplificată a tocoferolilor se prezintă în figura 4.4.

Tocoferolii α-, β-, γ- și δ — au catena liniară saturată formată din 12 atomi de carbon liniari și patru grupări metilice, iar tocoferolii ε -, ξ -, și η — au catena laterală formată tot din 12 atomi de carbon, dar cu trei duble legături situate la C-3—C-4; C-7'—C-8'; C-11'—C-12' și patru grupări metilice.

Activitatea biologică a tocoferolilor și a derivaților acestora depinde atât de numărul și poziția grupărilor metilice substituite la nucleul cromanic, cât și de felul și lungimea catenei laterale. Scurtarea catenei laterale de la C_{16} la C_{11} determină micșorarea de 10 ori a activității produsului obținut, iar înlocuirea acesteia cu o grupare metilică duce la pierderea completă a activității vitaminice. Înlocuirea ca-

Tabelul 4.1

Denumirea şi constituţia chimică a tocoferolilor

Felul tocoferolilor	Poziţia metililor substituiţi pe nucleul cromanic şi nume
α (alfa)	5,7,8-trimetil-tocol
β (beta)	5,8-dimetil-tocol
γ (gama)	7,8-dimetil-tocol
δ (delta)	8-metil-tocol
ε (eta)	5-metil-tocol
ξ (zeta)	5,7,8-trimetil-tocoferol
η (teta)	7-metil-tocol

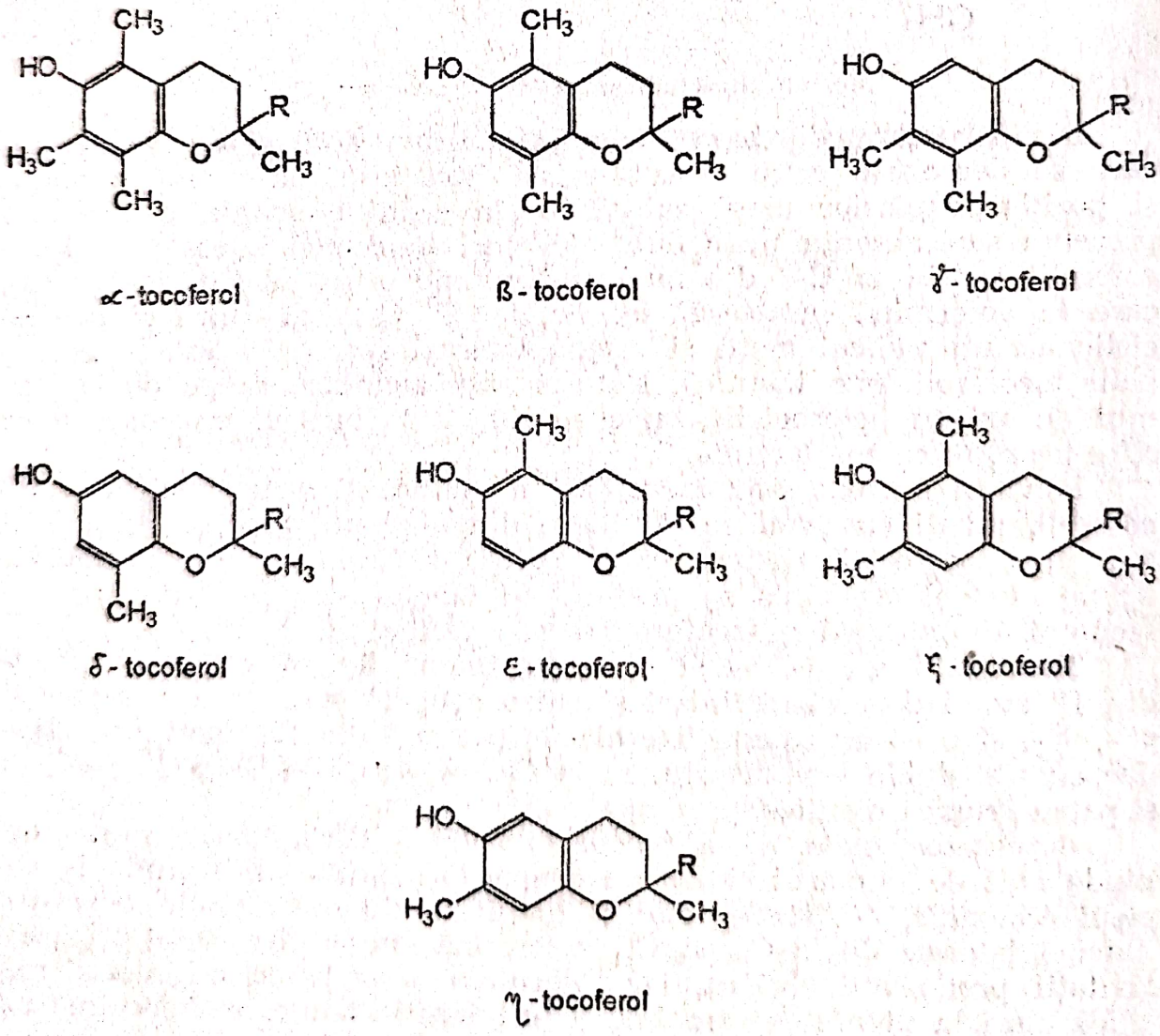


Fig. 4.4. Structura simplificată a unor tocoferoli

Scanned with OKEN Scanner

tenei laterale cu C_{16} a α-tocoferolului provenită de la fitol cu una cetilică cu C_{22} tocoferol, nu modifică activitatea acestui tocoferol. Intensitatea activității vitaminice a tocoferolilor cu aceeași catenă laterală, depinde de numărul grupărilor metilice din nucleul cromanic. Dintre tocoferoli, cea mai mare activitate vitaminică o are α-tocoferolul, după care urmează ß și γ-tocoferolii, care au numai 50% din activitatea α-tocoferolului, iar δ-tocoferolul este de 100 de ori mai puțin activ decât α-tocoferolul. Aceștia sunt de altfel cei mai puțin răspândiți și mai importanți tocoferoli.

Sinteza α-tocoferolului s-a realizat prima dată de P. Karrer în 1938, prin condensarea trimetilhidrochinonei cu bromura de fitil, în prezența clorurii de zinc, în mediu de benzen (figura 4.5).

Reacția decurge la o temperatură de 60—70°C, în atmosferă de azot. După degajarea completă a acidului bromhidric, produsul obținut este spălat cu apă și se face purificarea α-tocoferolului prin cromatografie pe coloană, folosind adsorbant Al_2O_3. Bromura de fitil se realizează prin bromurarea și hidrogenarea fitolului, care se poate extrage din produse naturale, din frunze, plantule și semințe încolțite.

Toți tocoferolii identificați în organismele vegetale și animale s-au obținut și prin sinteză, folosind hidrochinone alchilate și bromură de fitil, în prezența unor catalizatori.

Dintre compușii naturali cu structură și acțiune vitaminică similară ocoferolilor s-au identificat *tocotrienolii*, substanțe care au în catena laterală trei duble legături $-(CH_2-CH_2-CH=\underset{\displaystyle CH_3}{\overset{\displaystyle |}{C}}-)_3-CH_3$. Acești tocotrienoli se notează cu litere grecești similare tocoferolilor cu care au o structură similară la nucleul cromanic. Prin hidrogenarea enzimatică a acestora în organismele vegetale se obțin tocoferolii. Rolul lor biologic încă nu este cunoscut.

Prin înlocuirea grupării hidroxilice de la C-6 cu $-NH_2$ se obțin *tocoferolaminele* corespunzătoare diferiților tocoferoli. Dintre acestea,

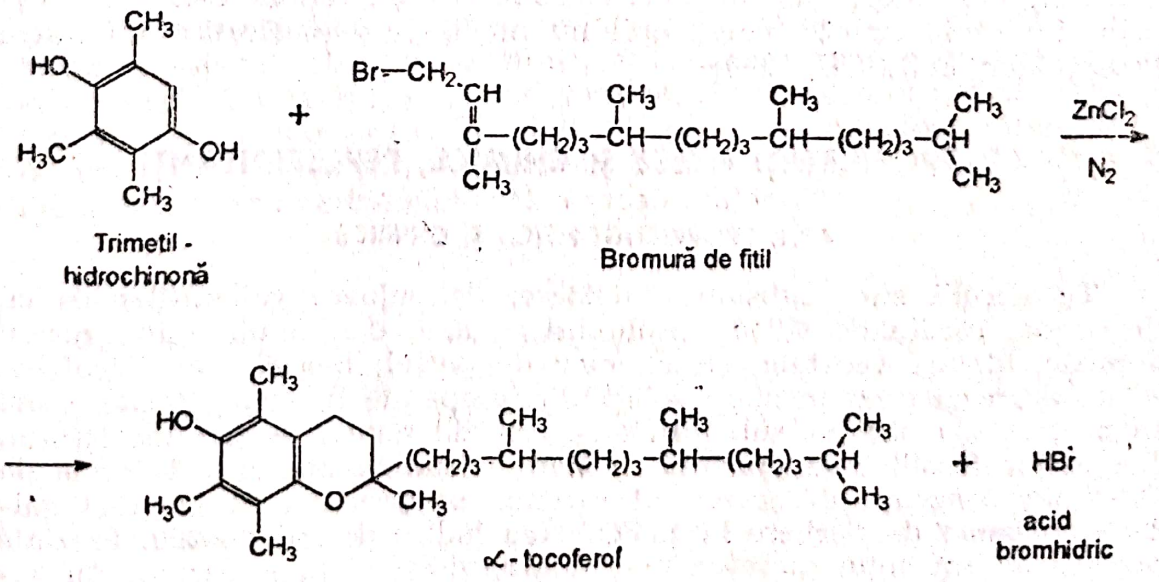


Fig. 4.5. Sinteza α-tocoferolului

α-tocoferolamina și *N-metil-β-tocoferolamina* au efecte similare cu acetatul de α-tocoferol în procesele de hemoliză și de reproducere la șobolani. Celelalte tocoferolamine au activitate biologică mai mică sau sunt chiar lipsite de activitate. În testul autooxidării, N-metil-β-tocoferolamina manifestă activitate biologică similară cu a α-tocoferolului, iar β-tocoferolamina are numai 50% din activitatea α-tocoferolului. Unele dintre aceste amine tocoferolice, cum este N-metil-β-tocoferolamina și N, N-dimetil-δ-tocoferolamina sunt utilizate ca antioxidanți alimentari netoxici.

Acțiunea antioxidantă a tocoferolilor este în relație invers proporțională cu cea vitaminică. Cea mai intensă activitate antioxidantă o are δ-tocoferolul și cea mai slabă α-tocoferolul.

Gruparea hidroxilică de la C-6 din nucleul cromanic se găsește în tocoferolii naturali, liberă sau esterificată. Esterificarea grupării OH menționate, mărește stabilitatea și activitatea vitaminică a tocoferolilor. Unii esteri (acetat, fosfat, butirat) ai tocoferolilor sunt mai activi decât tocoferolii cu hidroxilul fenolic liber, neesterificat. Dacă gruparea hidroxilică este îndepărtată, atunci tocoferolii își pierd activitatea vitaminică și caracterul antioxidant. Compusul dezoxi-α-tocoferol este inactiv și nu diferă de α-tocoferol decât prin lipsa hidroxilului fenolic. Dacă gruparea OH este înlocuită cu o grupare tioeterică, activitatea vitaminică se menține, dar se pierde caracterul antioxidant. În general eterificarea grupării OH determină pierderea activității biologice a tocoferolilor.

Mai recent, *N. Jaffe* și *C. Harris* apreciază activitatea vitaminică a tocoferolilor în cifre (respectiv procente) astfel:
$100\alpha > 40\beta > 8{,}3\gamma > 1\cdot\delta$. Alți autori redau activitatea tocoferolilor prin următoarele cifre: $100\alpha > 33\beta > 30\xi > 10\Upsilon > 5\varepsilon > 1\delta$. În ce privește proprietatea antioxidantă a tocoferolilor, aceștia se clasifică în ordinea $\delta > \gamma > \beta > \alpha$, care sunt de altfel cei mai răspândiți și mai importanți.

Prin înlocuirea grupărilor metil cu etil, la nivelul nucleului benzenic din ciclul cromanic, se produce o reducere a activității vitaminice a tocoferolilor, dar înlocuirea grupării metil de la C-2 a heterociclului piranic cu etil sau propil nu modifică semnificativ activitatea tocoferolilor (ENESCU, 1990).

4.3. PROPRIETĂȚI FIZICE ȘI CHIMICE, REPREZENTANȚI

4.3.1. PROPRIETĂȚI FIZICE ȘI CHIMICE

Tocoferolii sunt substanțe uleioase, de culoare galben-deschis cu densitatea medie de 0,953, insolubile în apă, dar solubile în grăsimi animale, uleiuri vegetale, alcool, eter de petrol, benzen etc. Tocoferolii se obțin cu greu în stare solidă din preparate înalt purificate. Până în prezent s-a obținut sub formă de cristale numai α- și γ-tocoferolul. Restul tocoferolilor se prezintă în stare cristalină numai sub formă de 3,5-dinitrobenzoați. α-Tocoferolul racemic se prezintă ca un ulei galben, cu punct de fierbere la 135°C și cu indice de iod de 220. Prezintă spectre de absorbție caracteristice în ultraviolet și în infraroșu. Au activitate optică datorită prezenței în molecula lor a trei atomi de car-

Scanned with OKEN Scanner

bon asimetrici (C-2, C-4', C-8'). α-Tocoferolul în soluție alcoolică este dextrogir, iar în soluție benzenică levogir. În lumină ultravioletă, maximul de absorbție pentru α-tocoferol este la 292 nm, pentru β-tocoferol la 287 nm, pentru γ-tocoferol la 298 nm. Unghiul de rotație specifică a luminii polarizate este pentru γ-tocoferol de (+)0,32°, pentru ß-tocoferol de (+)2,9°, iar pentru γ-tocoferol de (+)2,2°. Compușii sintetici sunt racemici. Tocoferolii sunt termolabili în prezența oxigenului și termostabili în absența acestuia, la temperaturi de peste 200°C. Se distrug sub acțiunea radiațiilor ultraviolete. Tocoferolii sunt compuși ușor autooxidabili, fapt pentru care îndeplinesc rolul de *antioxidanți puternici*. În aer tocoferolii se oxidează foarte ușor. Ei sunt sensibili la acțiunea oxigenului și a oxidanților. Tocoferolii, hidrochinona, acidul ascorbic și alți compuși naturali exercită o acțiune de protecție asupra unor substanțe biologic active, față de agenții oxidanți.

Prin oxidarea tocoferolilor se obțin compuși cu structură și activitate biologică diferită, în funcție de natura oxidanților folosiți. Astfel din α-tocoferol, priuntr-o oxidare blândă cu $FeCl_3$ sau $AgNO_3$ se obține p-tocoferilchinona și p-tocoferilhidrochinona, iar prin oxidare energică cu HNO_3 concentrat, se obține O-tocoferilchinona, de culoare roșie. Structura moleculară a acestor compuși se prezintă în figura 4.6.

În soluții alcaline și la temperaturi sub 40°C tocoferolii sunt în general stabili. Ei pot fi separați, purificați și identificați prin cromatografie pe coloană, în strat subțire sau pe hârtie, folosind ca adsorbanți oxid de aluminiu, carbonat de zinc și hârtie impregnată cu ulei de parafină sau $ZnCO_3$. Biosinteza tocoferolilor are loc în cloroplaste, probabil din γ-tocotrioli, care sunt hidrogenați enzimatic la tocoferoli și apoi metilați.

Cu derivații nitroși, tocoferolii dau colorații galbene, iar cu clorura ferică formează tocoferolchinone galbene, lipsite de activitate vitaminică. Tocoferolii sunt oxidați cu ușurință de ozon, H_2O_2, $KMnO_4$, $FeCl_3$, acid perbenzoic, peroxizii acizilor grași, $AgNO_3$, $KClO_3$ etc.

Tocoferolii, deși conțin la C-6 din nucleul benzenului o grupare OH, contrar fenolului normal, nu dau reacție de culoare cu $FeCl_3$ și nu posedă proprietate acidă care să-i permită dizolvarea în soluții alcaline. Ei prezintă însă spectrul de absorbție al fenolului în UV și stabilitatea esterilor față de acțiunea oxidanților. În terapeutică se folosesc esteri ai tocoferolilor, care sunt stabili la acțiunea oxidanților, în comparație cu tocoferolii în stare liberă, care sunt foarte sensibili la acțiunea oxigenului și a oxidanților. Prin esterificare crește atât stabilitatea cât și activitatea biologică a tocoferolilor.

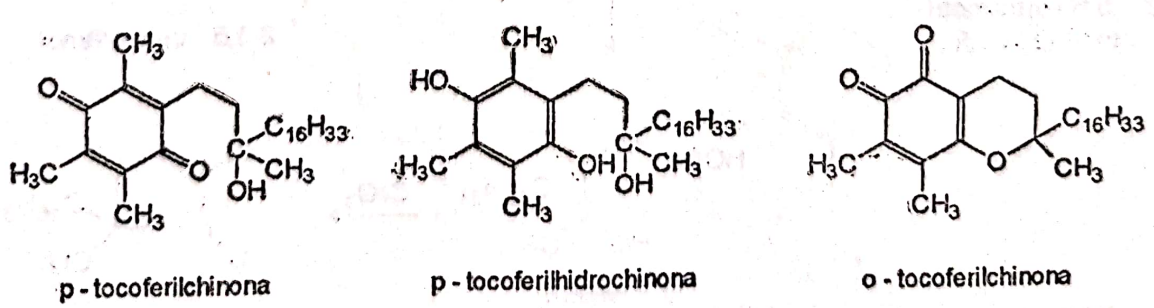


Fig. 4.6. Structura unor derivați oxigenați ai α-tocoferolului

Scanned with OKEN Scanner

α-Tocoferol. α-Tocoferolul se prezintă sub formă de ulei galben, cu maxim de absorbție în lumină ultravioletă la 292 nm, optic activ dextrogir (+)0,32°, cu indice de refracție la 1,505, densitate 0,953 la 15°C, masă moleculară de 430,72, cu atomii de carbon asimetrici C-2, C-4', C-8'.

Este insolubil în apă, dar solubil în grăsimi și solvenți organici. Nu se distruge în timpul preparării alimentare, iar în lipsa oxigenului rezistă la temperaturi de 250°C. Structura sa moleculară se prezintă în figura 4.7. Nu este distrus în mediu acid, dar se distruge în mediu alcalin, la temperaturi mai mari de 40°C. Se distruge foarte repede sub acțiunea unor oxidanți cum sunt $KMnO_4$, $AgNO_3$, $KClO_3$, H_2O_2, HNO_3 concentrat, clor, brom etc. De asemenea, se distruge ușor sub acțiunea razelor ultraviolete, a grăsimilor râncede, clorurii ferice etc. Lumina albă nu afectează tocoferolii.

Din α-tocoferol prin tratare termică la 350°C se obține 2,3,5,6-tetrametilhidrochinonă, prin descompunere cu acid iodhidric rezultă 2,3,5-trimetilfenolul, iar prin tratare cu acid cromic se obține un hidroxiacid, care trece ușor în lactonă (figura 4.8).

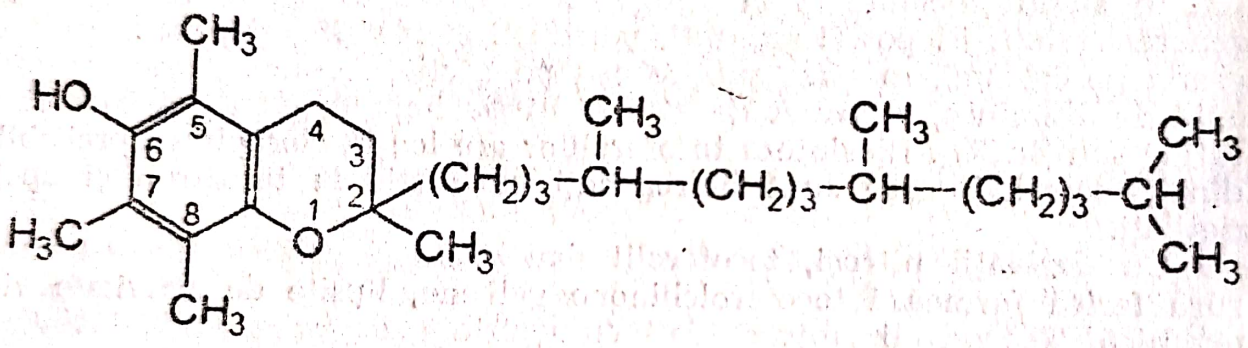


Fig. 4.7. Structura moleculară a α-tocoferolului

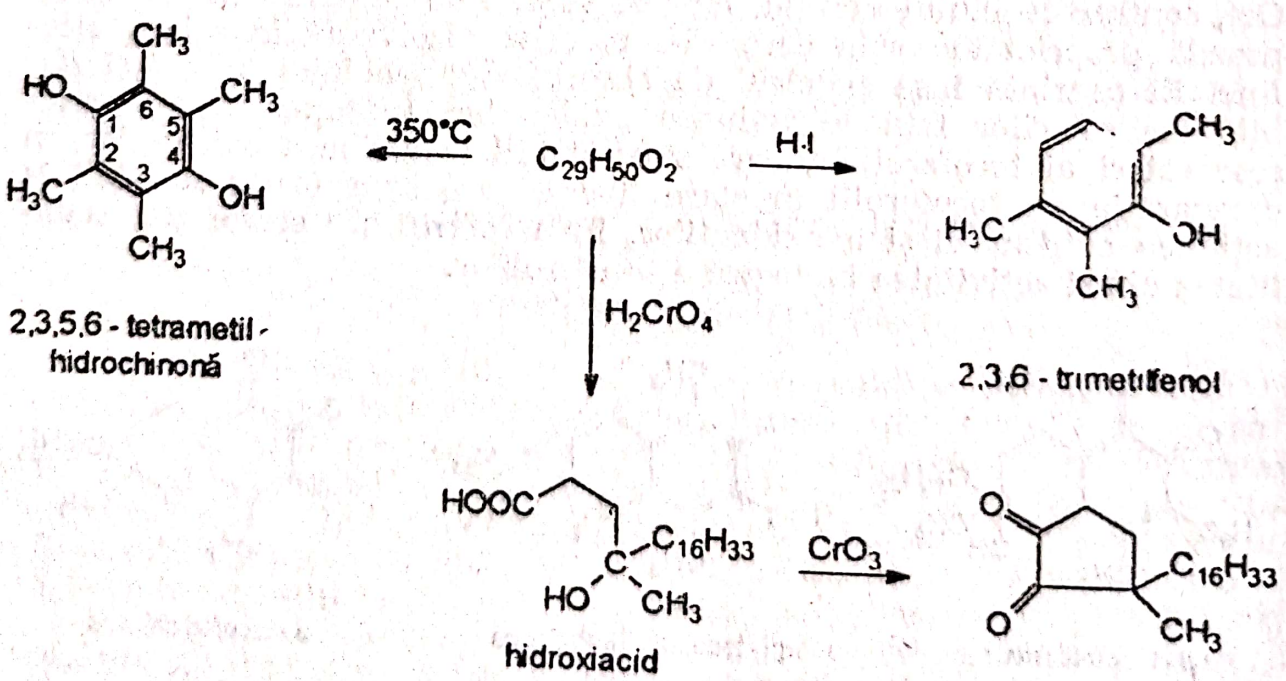


Fig. 4.8. Derivați ai α-tocoferolului

Scanned with OKEN Scanner

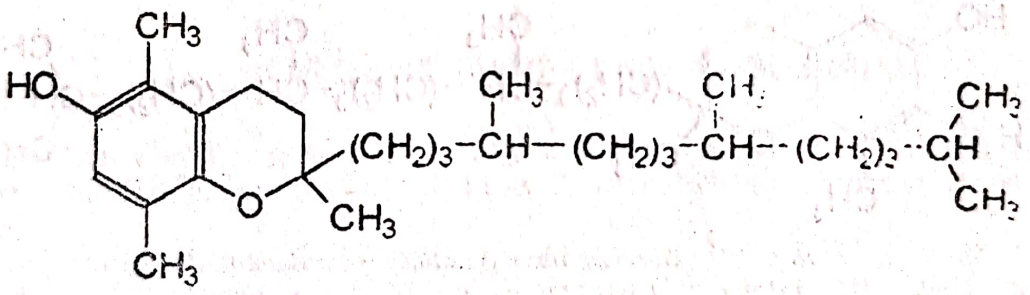
Prin tratarea α-tocoferolului cu $AgNO_3$ se obține p-tocoferilchinona, care prin reducere formează p-tocoferilhidrochinona.

Pentru extragerea tocoferolilor din surse naturale se folosesc predominant germenii de grâu, care conțin 200—300 mg tocoferoli/100 g material. Ca procedeu, se pun semințe de grâu la încolțit, iar germenii se selectează, se usucă și se extrag cu solvenți organici (eter, benzen, acetonă), iar după îndepărtarea solvenților se obține „uleiul de germeni de grâu", care reprezintă 8—10% din greutatea semințelor încolțite. Acest ulei de germeni se va saponifica cu soluție alcoolică de KOH, apoi se va transfera în eter de petrol, soluția se va spăla și se va cromatografia pe coloană cu Al_2O_3 ca adsorbant, iar developarea coloanelor se va face tot cu eter de petrol. Prin extragerea din produse vegetale se obțin concentrate tocoferolice, care conțin între 4 și 65% α-tocoferol.

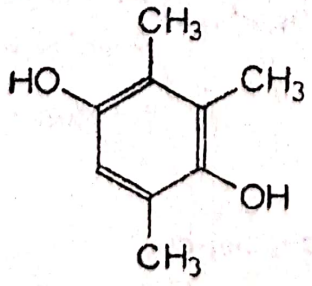
Uleiul din fructe coapte de cătină conține tocoferoli într-o proporție de 200 mg%, iar uleiul de soia conține 120 mg%. În uleiul de porumb și respectiv de floarea soarelui conținutul tocoferolilor este de aproximativ 100 mg%.

ß-Tocoferol. Formula structurală a ß-tocoferolului se prezintă în figura 4.9. β-Tocoferolul are formula brută $C_{28}H_{48}O_2$, masa moleculară 416,69 și prezintă două grupări metil pe inelul benzenic la C-5 și C-8, în poziție para. Este un homolog inferior al α-tocoferolului.

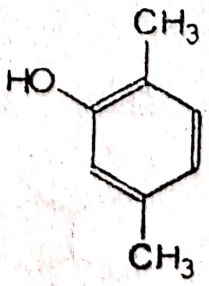
Prin piroliză la 350°C, din β-tocoferol se obține trimetilhidrochinona (a), iar prin tratare cu acid iodhidric se formează O-xilenul (b) (figura 4.9 a și b). β-tocoferolul se prezintă sub forma unui ulei gal-



ß - tocoferol



(a)



(b)

Fig. 4.9. Structura moleculară a β-tocoferolului, trimetilhidrochinonei și a o-xilenului

ben gros, care rotește planul luminii polarizate la (+)2,9°. Are absorbție maximă în lumină UV la 297 nm. Purificarea se face prin intermediul alofanatului, care cristalizează ușor.

γ-Tocoferol. γ-Tocoferolul este un izomer al β-tocoferolului de care se deosebește prin poziția grupărilor metilice de la nucleul benzenic, situate la atomii C-7 și C-8. Formula structurală se prezintă în figura 4.10. A fost izolat din uleiul obținut din semințe de bumbac, de către *G. Emerson*. Se prezintă sub formă de ulei vâscos, din care nu a putut fi cristalizat inițial. În prezent, s-a obținut în stare cristalină, prin metode cromatografice. Prin oxidarea γ-tocoferolului se obține o lactonă ($C_{21}H_{40}O_2$). γ-Tocoferolul are maximul de absorbție în UV la 298 nm, iar unghiul de rotație a luminii polarizate la (+) 2,2°. Are activitate vitaminică mai slabă decât α- și β-tocoferolul, dar activitatea antioxidantă este mai puternică. γ-Tocoferolul și η-tocoferolul, spre deosebire de alți tocoferoli dau cu diazodianisidină o coloratie roșie.

δ-Tocoferolul. δ-Tocoferolul are formula elementară $C_{27}H_{46}O_2$. Conține un singur metil în ciclul benzenic la C-8. A fost izolat în 1947 de către *H. Stern* și colab., din uleiul de soia sub formă esterificată cu acidul palmitic. Uleiul din boabe de soia este o sursă bogată de δ-tocoferol, a cărui conținut reprezintă 30%. Are masa moleculară 402,67 UMA, rotația specifică (+)3,4° în etanol și (+)1,1° în benzol. La temperatura camerei palmitatul δ-tocoferolului se prezintă sub formă uleioasă. Restul esterilor tocoferolilor se prezintă în stare solidă, sub formă cristalină. Structura sa moleculară se se prezintă în figura 4.11.

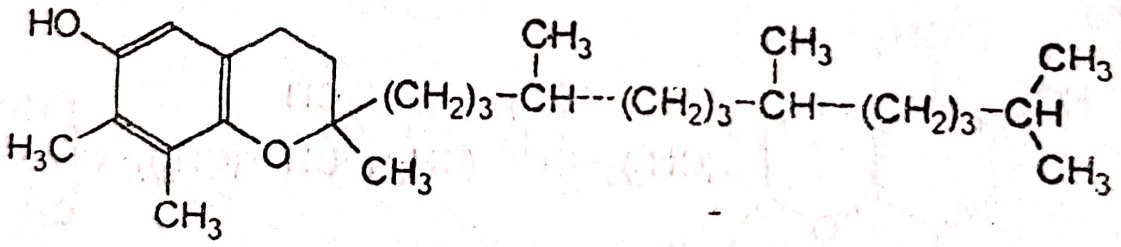


Fig. 4.10. Structura moleculară a γ-tocoferolului

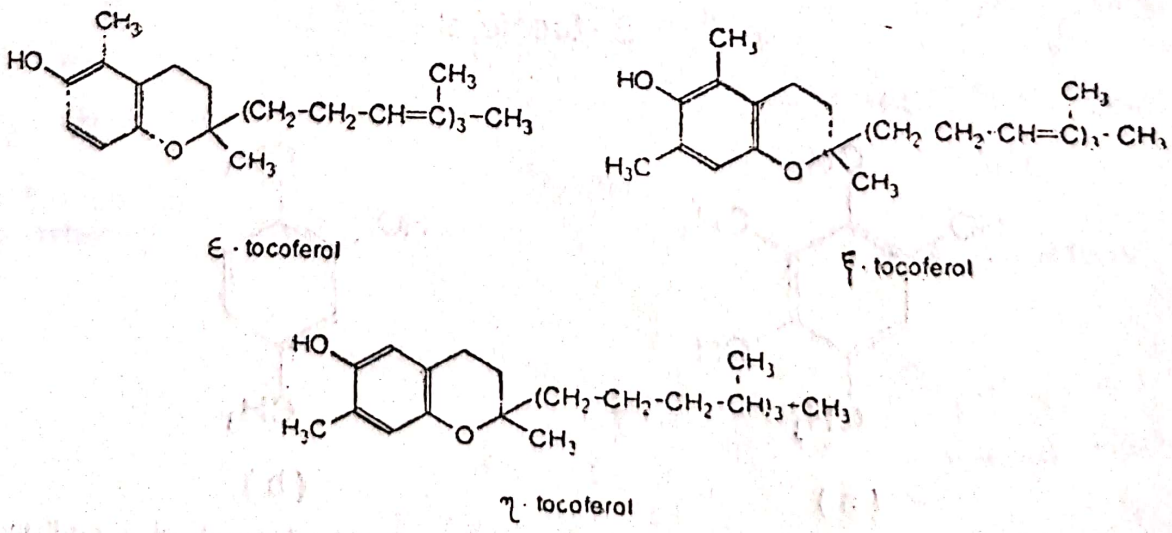


Fig. 4.11. Structura moleculară a ε-, ξ-, η-tocoferolilor

Scanned with OKEN Scanner

Are absorbția maximă în lumina UV la 298 nm. Prin oxidare δ-tocoferolul trece în parachinonă de culoare galbenă, care prin reducere va forma hidrochinona. Are o acțiune protectoare antioxidantă asupra pigmenților carotenoidici, vitaminelor A, D, C etc. Puterea sa vitaminică este de 100 de ori mai mică decât a α-tocoferolului.

ε-, ξ-, η-tocoferoli. Acești tocoferoli sunt mai puțin răspândiți în natură. Au importanță practică mică. Sunt importanți mai mult sub aspect structural. Au atât activitate vitaminică, cât și antioxidantă mai slabă. Formula lor structurală se prezintă în figura 4.11.

ε -Tocoferolul a fost izolat în 1956 de către *H. Eggit* din germeni de grâu. Se găsește în cantitate ceva mai mare și în plantule de orz, ovăz și orez. Are aceeași structură moleculară la nivelul nucleului cromanic ca și β-tocoferolul, de care se deosebește prin catena laterală, care conține trei duble legături nesaturate.

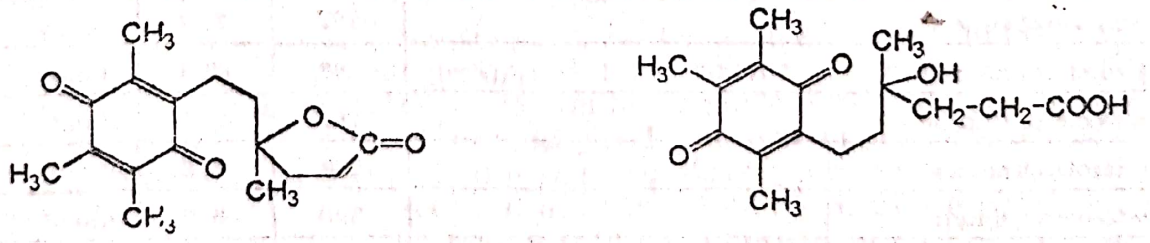
ξ -Tocoferolul a fost izolat de *J. Green* din uleiul de palmier în 1955. Ulterior s-a extras și din uleiurile de secară, orz, ovăz, orez etc., stabilindu-se că acest tocoferol are proprietăți reducătoare intense. ξ -tocoferolul natural are maximul de absorbție la 292,5 nm, în lumină UV, iar produsul sintetic la 294 nm. Are formula moleculară $C_{29}H_{44}O_2$ și masa moleculară egală cu 424,67 UMA. Se deosebește de α-tocoferol prin catena laterală care conține trei duble legături. Are activitate vitaminică în proporție de 30% față de α-tocoferol.

η-Tocoferolul are formula brută $C_{27}H_{46}O_2$ și masa moleculară de 402,67 UMA. A fost izolat de *J. Green* și colab. în 1956 din orez (ENESCU, 1990). Absorbția maximă în lumină ultravioletă este la 293 nm.

4.4. METODE DE IDENTIFICARE ȘI DOZARE

Pentru identificarea și dozarea tocoferolilor se pot folosi metode fizice, chimice și biologice, ultimele fiind cele mai sigure și mai specifice.

Metodele fizice se bazează pe lungimea de undă a benzilor de absorbție în lumină ultravioletă, care sunt caracteristice atât pentru tocoferolii existenți în stare liberă, cât și a produșilor de oxidare ob-



A — Lactona compusului 2 -(3 - hidroxi - 3 - metil - 5 - carboxipentil) - 3,5,6 - trimetil - 1,4 - benzochinonă

B — 2 - (3 - hidroxi - 3 - metil - 5 - carboxipentil) - 3,5,6 - timetil - 1,4 - benzochinonă

Fig. 4.12. Produs de eliminare a α-tocoferolului

Scanned with OKEN Scanner

ținuți cu $AgNO_3$, $FeCl_3$ și alți oxidanți. Benzile de absorbție cele mai caracteristice sunt situate la 292, 297, 300 nm. Carotenoidele îngreunează în mare parte dozarea tocoferolilor pe baza spectrelor de absorbție, fapt pentru care vor trebui îndepărtate din materialul de analizat.

Pentru a înlătura eventualele interferări ale spectrelor de absorbție a tocoferolilor cu cele ale carotenoidelor, sterolilor, vitaminelor K etc., în mod practic se produce oxidarea tocoferolilor cu $AgNO_3$ în soluție de alcool metilic, cu formarea unei chinone ce are maximul de absorbție la 265 nm, cu coeficient de extincție de 4 ori mai mare decât tocoferolul din care s-a obținut. Lungimile de undă ale maximelor de absorbție și valoarea coeficienților specifici de absorbție ai tocoferolilor se prezintă în tabelul 4.2.

Metodele fizico-chimice se bazează pe măsurarea colorimetrică a produșilor de oxidare ai tocoferolilor cu diferiți oxidanți. Astfel, cu acidul azotic α-tocoferolii în soluție alcoolică dau o coloratie roșie, iar în soluție alcool-cloroformică dau o coloratie albastră. Compușii obținuți se dozează colorimentric în raport cu o probă martor. Mai recent se folosește acidul fosfomolibdenic sau acidul fosfomolibdowolframic, care dau cu o soluție de α-tocoferol o coloratie galben-verzuie, care se colorimetrează la concentrații de până la 150 μg/ml. Această reacție nu interferează cu sterolii dar interferează cu carotenoidele.

Metodele chimice cele mai des folosite pentru dozarea tocoferolilor din preparatele farmaceutice sau din serul sanguin se bazează pe reacția de oxidare a tocoferolilor, folosind ca oxidant $FeCl_3$ în soluție alcool-cloroformică, în mediu neutru, cu apariția unei culori albastre, fotocolorimetrabile. Se adaugă și α, α'-dipiril pentru dozarea Fe^{2+} care se formează prin reducerea $FeCl_3$. Se lucrează la întuneric sau la lumină obscură, deoarece lumina dă naștere la compusul colorat chiar și în proba martor. Deoarece această reacție interferează cu diferite sub-

Tabelul 4.2

Maximele de absorbție ale tocoferolilor în lumină ultravioletă, în nm

Felul tocoferolilor	Maxim de absorbție		Solvent
	nm	$E^{1\%}_{1\ cm}$	
α-tocoferol natural	293	188	izooctan
α-tocoferol natural	292	73,7	etanol
α-tocoferol sintetic	292	74,7	etanol
β-tocoferol natural	297	87,6	etanol
β-tocoferol sintetic	297	85,1	etanol
γ-tocoferol natural	298	92,8	etanol
γ-tocoferol sintetic	300	89,2	etanol
δ-tocoferol natural	298	91,2	etanol
Palmitat de tocoferol	286	26,8	etanol
ξ-tocoferol natural	292,2	91,0	etanol
η-tocoferol natural	293	78,0	etanol

Scanned with OKEN Scanner

stanțe reducătoare, inclusiv cu carotenoidele, $FeCl_3$ se înlocuiește cu $K_3[Fe(CN)_6]$, în soluție alcool-cloroformică. Această substanță reacționează cu tocoferolii în maximum 15 secunde, timp în care carotenoidele nu reacționează.

Prin încălzirea α-tocoferolului în soluție alcoolică cu HNO_3, se obține o chinonă de culoare roșie, cu maximul de absorbție la 450 nm. Cu $AuCl_3$, la 50°C, tocoferolii se pot doza prin metode electrometrice. În toate reacțiile de culoare, intensitatea culorii compușilor obținuți depinde de felul tocoferilor utilizați. Astfel, tocoferolii de tip α (cu trei metili în nucleul benzenic) prezintă intensitate maximă notată cu 100%. Cei cu doi metili, de tip γ sau ß, au intensitatea culorii redusă la 50% în comparație cu cea a α-tocoferolului, iar δ-tocoferolul, cu un metil la inelul benzenic, intensitatea culorii scade la 25%.

Produșii de oxidare ai tocoferolilor depind de structura acestora, felul oxidanților și mediul de reacție. Experimental s-a stabilit că prin oxidarea blândă a α-tocoferolilor (cu $FeCl_3$, $AgNO_3$, $K_3[Fe(CN)_6]$, sau prin titrare potențiometrică (cu $AuCl_3$) se obține tocoferilchinona, care prin reducere cu Pd/alcool sau Zn/acid acetic, se transformă în tocoferilhidrochinonă, compus inactiv în combaterea sterilității la șobolani, dar activ asupra distrofiei musculare.

Prin oxidarea tocoferolilor cu acid fosforic, sulfuric sau tartric, se formează croman-5,6-chinona și alți produși, iar prin oxidare cu $K_3[Fe(CN)_6]$, în anumite condiții de reacție, pe lângă chinone se obțin și dimeri, trimeri ai tocoferolilor.

Metodele chimice nu sunt destul de precise și specifice, deoarece unii compuși apropiați structural de tocoferoli, cum sunt tocoferilchinona, carotenoide, steroli, denaturează rezultatele. De asemenea este dificilă separarea celor 7 tocoferoli cunoscuți până în prezent.

Din uleiurile vegetale și din grăsimile animale, tocoferolii se dozează, în urma saponificării materialului respectiv, cu o soluție alcoolică de KOH 2N, la rece, în atmosferă de azot, în prezența hidrochinonei ca reducător. Partea nesaponificabilă este tratată cu eter, iar reziduul cu floridină, pentru îndepărtarea carotenoidelor. Sterolii sunt eliminați prin refrigerare și filtrare, iar soluția alcoolică ce conține tocoferoli se tratează cu o soluție de acid fosfomolibdenic, cu care formează o coloratie galben-verzuie. Tocoferolii se pot doza prin metode cromatografice (în coloană, strat subțire sau hârtie impregnată cu diferiți adsorbanți), polarografic, sau pe cale gaz-cromatografică.

Metodele cromatografice, folosind hârtie siliconică sau impregnată cu ulei de parafină, permit separarea tocoferolilor pe grupe, în funcție de numărul grupărilor metilice existente la nucleul benzenic, în grupe cu 3, 2 și respectiv un metil, dar nu pot fi separați cei din aceeași grupă. Cromatografia pe hârtie impregnată cu $ZnCO_3$, eluată cu ciclohexan și identificarea zonelor cu $FeCl_3$, și α, α'-dipiridil, dă rezultate bune pentru α și β-tocoferoli. Dacă se folosește hârtie impregnată cu $ZnCO_3$, apoi pe aceeași hârtie se impregnează și ulei de parafină, folosind ca eluent ciclohexan, iar pentru colorarea tocoferolilor se folosește $FeCl_3$ în amestec cu α, α'-dipiridil, se pot separa și doza toți cei 7 tocoferoli cunoscuți (BEDELEANU, 1985).

Metodele biologice se bazează pe acțiunea curativă sau profilactică a tocoferolilor asupra simptomelor de sterilitate care apar în stări

Scanned with OKEN Scanner

carențiale a vitaminelor E specifice la șobolan. Hrana zilnică carențată în tocoferoli este formată din amidon 40%, cazeină 32%, grăsime de porc 22%, lebertar 2%, drojdie de bere 0,4—0,5%, amestec de săruri 2%.

Pentru stabilirea testului sterilității, puii de șobolan femele sunt supuși după naștere unui regim carențat în tocoferoli. Când ajung la greutatea de 150 g se împerechează cu masculi sănătoși. În timp ce șobolancele din lotul martor nasc pui sănătoși la 20—21 zile de la împerechere, cele cu regim carențat încep să piardă din greutate, începând cu ziua a 16-a, când se produce întreruperea sarcinii, respectiv moartea și resorbția fătului. Intensitatea efectului antisterilic descrește în ordinea $\alpha > \beta > \gamma > \delta$-tocoferolilor. Dacă animalelor din lotul experimental, începând cu ziua a 16-a li se adaugă în hrană zilnic 1 mg de acetat de α-tocoferol, se previne resorbția fătului la 50% din cazuri. Dacă în hrana șobolancelor carențate se adaugă zilnic 1,8—2,7 mg α-tocoferol, se reface fertilitatea întregului lot, sarcina putând fi dusă până la termen.

Un alt test constă în supunerea șobolancelor la un regim carențat în tocoferoli numai după a 14-a zi de la naștere, în comparație cu lotul martor hrănit normal.

După fecundare, sarcina este controlată prin semnul placentar sau eritrocitar (adică prezența eritrocitelor în canalul vaginal), iar animalele se cântăresc periodic în timpul gestației. Se notează data avortării sau resorbția fătului la exemplarele carențate.

Ca metodă biologică se utilizează și injectarea aloxanului sau a acidului dialuric, care produce o hemoliză accentuată la animalele carențate. Hemoliza nu apare la lotul martor și se vindecă la animalele carențate după adăugarea tocoferolilor în hrana lor. Efectul maxim în vindecare apare prin administrarea de 2—3 mg/zi de α-tocoferol. Efectul β și γ-tocoferolului la același tratament este de 50%, iar al δ-tocoferolului de 1%. Sensibilitatea eritrocitelor la hemoliză se utilizează și în depistarea avitaminozelor E la oameni. Eficacitatea tocoferolilor asupra inhibiției hemolizei produsă de acidul dialuric, descrește în ordinea: $\alpha > \beta > \eta > \xi$.

Ca test de activitate vitaminică E se întrebuințează și diateza exsudativă alimentară a puilor de găină, care apare în carența tocoferolilor (ENESCU, 1990).

Testul de fertilitate a α-tocoferolilor s-a efectuat și cu *Daphnia magna*, crustaceu transparent, la care s-a determinat creșterea ovarelor și a embrionilor partenogenetici în sacul de încuibare.

La șobolanii masculi, efectul terapeutic al tocoferolilor s-a determinat prin observarea și aprecierea modificărilor ireversibile care apar la nivelul testicolelor, a dereglării tubilor seminiferi în stări carențiale și a secreției spermatozoizilor.

Testele clinice urmăresc alterările musculare, evidențiate pe biopsii, precum și efectele antioxigen ale tocoferolilor „in vitro" sau „in „vivo". Activitatea medie a tocoferolilor, apreciată în procente de mai mulți cercetători în diferite teste se prezintă astfel:

— activitate vitaminică $100\alpha > 50\beta > 40\gamma > 1\delta$;
— activitatea antisterilică $100\alpha > 40\beta > 30\gamma > 1\delta$;

Scanned with OKEN Scanner

— activitatea antihemolitică $100\alpha > 50\beta > 50\gamma > 1\delta$;
— intensitatea culorii compușilor cu fosfomolibdat $100\alpha > 60\beta > 60\gamma > 25\delta$;
— caracter antioxidant (in vitro) $270\delta > 180\gamma > 130\beta > 100\alpha$.

4.5. RĂSPÂNDIREA ÎN NATURĂ

Tocoferolii sunt substanțe organice larg răspândite în natură, mai ales în organismele vegetale, care au capacitatea de a-i biosintetiza. În cantitate mai mare se găsesc în uleiurile obținute din semințe germinate de cereale și plante leguminoase, în nuci, arahide, migdale, varză roșie, porumb, soia, ulei de bumbac etc. În tabelul 4.3 se prezintă conținutul mediu al tocoferolilor din diferite produse almientare în mg/100 g produs. În frunze, conținutul α-tocoferolului variază între 80—250 μg/g.

Tabelul 4.3

Conținutul mediu al tocoferolilor din produse alimentare, în mg/100 g produs

Produs alimentar	Conținutul tocoferolilor (mg/100 g produs)
Ulei din germeni de grâu	250—500
Ulei de soia	200—250
Ulei din germeni de porumb	230—250
Ulei de bumbac	300—350
Ulei de tărâțe	250—320
Ulei de secară	200—248
Ulei de orz	200—238
Ulei de palmier (roșu)	100—120
Ulei de arahide	26—30
Ulei de floarea-soarelui	5—8
Ulei de măsine	20—25
Ulei de rapiță	50—60
Ulei de muștar	30—35
Ulei de ovăz	60—70
Grăsime de cocos	12—15
Făină de grâu	20—25
Germen de grâu	27—30
Porumb	16—25
Tărâțe de grâu	15—18
Soia	10—12
Mazăre	4—8
Fasole	1,2—4,0
Salată	1,5—4,0
Morcovi	1,5—2,0
Varză albă	0,7—1,8
Pâine neagră	2,2—5
Pâine albă	1,3—1,5
Unt	3—5
Ouă de găină	1—3
Brânză	0,9—3
Carne de vită	1,5—7
Ficat de vită	1,5—7
Lapte de vacă	0,2—0,8
Lapte de femeie	0,8—1,8
Lapte praf	0,3—0,9

Scanned with OKEN Scanner

Biosinteza tocoferolilor are loc în cloroplaste unde se găsește și fitolul, care servește atât la esterificarea clorofilelor cât și la formarea tocoferolilor. Tocoferolii din semințe, unde se acumulează în cantități mai mari, provin probabil din frunze. Embrionul din plante conține o cantitate mai mare de tocoferoli decât sămânța.

Tocoferolii se găsesc în cantitate relativ ridicată și în polen. Astfel, în polenul florilor de măr, conținutul tocoferolilor este în medie de 80 μg/g, iar în polenul unor scaieți galbeni din genul *Echinops*, de 170 μg/g.

Pe scară industrială, tocoferolii se extrag din germeni de grâu, care au un conținut mediu de 2,55 mg/g.

Conținutul mediu al tocoferolilor din partea edibilă a fructelor și legumelor se prezintă în tabelul 4.4. Un conținut ridicat în tocoferoli au migdalele, nucile, arahidele, fasolea, soia, mazărea, morcovii, țelina etc., iar foarte redus îl au portocalele, cireșele căpșunii, ceapa, pepenii, cartofii, ridichile etc.

Tabelul 4.4

Conținutul mediu al tocoferolilor din fructe și legume proaspete, în mg/100 g parte edibilă

Fructe și legume	Conținut mediu (mg/100 g)
Migdale	26,10
Nuci	24,70
Arahide	20,16
Fasole-soia	10—15
Morcovi	3—18
Mazăre boabe (verde)	4—6
Țelină	2,6
Fasole boabe	2,3
Andive	2,0
Pătrunjel	1,8
Spanac	1,7
Zmeură	1,4
Păstârnac, agrișe, coacăze	1,0
Ardei verde	0,65
Prune	0,8
Lămâi	0,8
Piersici	0,6
Mere	0,57
Caise	0,50
Tomate	0,49
Pere	0,43
Salată	0,39
Fasole verde	0,28
Portocale	0,24
Cireșe	0,27
Căpșuni	0,22
Varză albă	0,7
Ceapă, castraveți, varză roșie	0,2
Pepeni	0,1
Cartofi	0,1
Ridiche	0,03

Scanned with OKEN Scanner

Conținutul procentual al diferiților tocoferoli din uleiurile vegetale se prezintă în tabelul 4.5.

După cum rezultă din datele prezentate în tabelul 4.5 α și γ-tocoferolii au o largă răspândire în uleiurile vegetale. δ-Tocoferolul se găsește în cantitate mai mare în uleiurile de soia, muștar și ovăz, iar ε-tocoferolul în ulei de orz, secară și ovăz. ξ-Tocoferolul are un conținut relativ ridicat în uleiul de orz, secară, ovăz și orez. Uleiurile vegetale reprezintă sursa cea mai bogată în diferite tipuri de tocoferoli.

În organismele animale, care nu pot biosintetiza tocoferolii, aceștia sunt preluați din hrană, iar cantitatea lor din diferite organe (muschi, sânge, ficat, pancreas, inimă, rinichi) depinde de conținutul tocoferolilor din alimentele ingerate. Cea mai mare cantitate de tocoferoli se înmagazinează în grăsimea de rezervă. La bărbați, cantitatea de tocoferoli este în medie de 3,44 g/70 kg corp, iar la femei de 8,12 g/50 kg corp, fiind sensibil cu mult mai mare decât la bărbați.

Omul, la fel ca animalele, își procură tocoferolii din hrană, care vor fi absorbiți prin intestin în prezența bilei și a sucului pancreatic. Conținutul tocoferolilor din sânge depinde de aportul lor alimentar, având la oamenii sănătoși o valoare medie de 1,2 mg/100 ml. Conținutul mediu al tocoferolilor la omul adult și la făt, în diferite organe se prezintă în tabelul 4.6.

După cum rezultă din datele prezentate în tabelul 4.6, atât la oamenii adulți cât și la făt, cele mai bogate organe și țesuturi în tocoferoli sunt glandele suprarenale, miocardul, țesutul adipos, creierul la omul adult, laptele la femei, testiculele și ovarele, glanda tiroidă, ficatul, în general organele și țesuturile cu activitate biologică intensă.

Tocoferolii se găsesc în organismele vegetale și animale împreună cu alte substanțe antioxidante. Compușii antioxidanți care au un potențial oxidoreducător mai puternic (cu valori mai mici) decât al tocoferolilor, îi protejează de degradări oxidative, rol pe care îl îndeplinesc și tocoferolii față de compușii antioxidanți cu potențial mai

Tabelul 4.5

Conținutul în tocoferoli ale diverselor uleiuri, în procente din total
(după ENESCU, 1990)

Ulei	Total tocoferoli (mg/g)	Felul tocoferolilor (% din total)						
		α	β	λ	δ	ε	ζ	η
Germeni de grâu	2 55	56	33,5	—	—	10,5	—	—
Tărâțe	3,20	11	5,5	—	—	68	15,5	—
Porumb	0 91	11	—	89	—	—	—	—
Rapiță	0,56	27	—	73	—	—	—	—
Soia	1,18	13,5	—	59	27,5	—	—	—
Muștar	0,32	26,8	—	55	18	—	—	—
Bumbac	0,81	58	—	42	—	—	—	—
Arahide	0,2	35,5	—	64	—	—	—	—
Orz	2,38	15,33	—	6	—	34,2	44,5	—
Secară	2,48	39	—	5	—	32	24	—
Ovăz	0,61	28	—	36	10	4	22	—
Orez	0,74	47	—	—	—	—	26	27

Scanned with OKEN Scanner

Tabelul 4.6

Conținutul mediu al tocoferolilor la omul adult și la făt, în diferite organe, exprimat în mg%/100 g țesut (după ENESCU, 1990)

Organe (100 g)	Conținut tocoferoli (mg%)	
	Adult	Făt
Ficat	0,720	0,420
Rinichi	0,370	0,370
Splină	0,420	0,350
Plămâni	0,359	0,230
Creier	0,930	—
Mușchi scheletici	0,430	—
Miocard	1,890	0,550
Uter	0,410	—
Pancreas	0,010	—
Tiroidă	0,870	—
Suprarenale	18,830	6,800
Testicul	1,610	—
Ovare	0,640	—
Țesut adipos	2,300	1,010
Placentă	0,530	—
Lapte	0,940	—

mic de oxidoreducere (cu valori redox mai mari). Tocoferolii din alimente rezistă la prepararea termică, dar nu în grăsimile râncede, care repede îi distrug. La om și animale datorită structurii lipofilice, tocoferolii se acumulează în lipoproteinele circulante (plasmă, sânge), în membranele celulare și în grăsimile de depozit, protejându-le de acțiunea oxigenului, a unor radicali sau peroxizi.

4.6. ABSORBȚIE, TRANSPORT ȘI NECESITĂȚI

Tocoferolii sunt absorbiți din alimente în organism la nivelul mucoasei intestinale, în prezența bilei și a sucurilor pancreatice. Capacitatea de absorbție pare a fi însă limitată, întrucât administrarea unor cantități mari de tocoferoli sintetici are ca efect creșterea procentului de eliminare a acestora prin fecale. Capacitatea de absorbție a tocoferolilor prin intestin este mai mare la femei decât la bărbați. De la nivelul intestinului, tocoferolii absorbiți trec în limfă sub formă de chilomicroni, care ajung în circulația sanguină, fiind vehiculați de β-lipoproteinele plasmatice din organism.

Tocoferolii sunt depozitați la început în ficat și ulterior în restul organelor și țesuturilor prezentate în tabelul 4.6.

Eliminarea tocoferolilor se realizează în cea mai mare parte prin fecale. Experimental s-a dovedit la iepuri că prin administrarea „per os" a 10—15 mg succinat de α-tocoferol, marcat cu ^{14}C, din cantitatea dată se găsește în fecale după trei zile, 65%, iar după 6 zile 80%. În această perioadă de timp, urina nu a prezentat radioactivitate. Excreția tocoferolilor prin fecale este mai mare la bărbați decât la femei. Dacă administrarea tocoferolilor se face pe cale intravenoasă, aproximativ 90% din radioactivitatea aerului începe să dispară, în timp de 24 de ore. După 15—20 de zile de la administrare restul de radioacti-

Scanned with OKEN Scanner

vitate s-a regăsit aproape cantitativ în fecale și urină. Cea mai mare parte a α-tocoferolului se găsește în fecale și urină sub forma unui nou metabolit chinonic 2(3-hidroxi-3-metil-5-carboxipentil)3,5,6-trimetilbenzochinona (fig. 4.12, B), care în lumina ultravioletă prezintă un spectru de absorbție identic cu cel al α-tocoferolchinonei. Acest nou compus se găsește și sub formă de lactonă, care are catena laterală transformată într-o lactonă cu trei atomi de carbon (fig. 4.12, A).

Excreția tocoferolilor se face în cea mai mare parte prin fecale, urină și bilă. Prin urină tocoferolii se elimină predominant sub formă de glucuronați sau derivați chinonici.

Bila și sucurile pancreatice au un rol însemnat în absorbția tocoferolilor. În lipsa acestora în intestin apar simptome de avitaminoze E, chiar dacă hrana consumată este bogată în tocoferoli, fiind dereglat procesul de absorbție. O absorbție scăzută a tocoferolilor la om s-a remarcat și în anumite afecțiuni pancreatice, intestinale și hepatice, precum și după gastrectomie, ingestie de parafină, vazelină și chiar ulei de pește.

Fătul își ia tocoferolii de la mamă, prin intermediul placentei. In timpul sarcinii conținutul tocoferolilor din sânge crește concomitent cu evoluția sarcinii. La naștere, conținutul tocoferolilor noului născut este mai mic decât la mamă. În timpul alăptării, sugarul primește tocoferoli prin laptele mamei, care este mult mai bogat în tocoferoli (0,94 mg%) decât laptele de vacă (0,06 mg%).

Conținutul mediu al tocoferolilor în plasma omului adult este în medie de aproximativ 1,2 mg/100 ml, cu limite variabile. În Anglia valoarea medie este de 1,31 mg/100 ml, cu limite variind între 0,60—2,91 mg/100 ml. În Olanda s-au găsit la adulți valori ale tocoferolilor cuprinse între 0,88—2 mg/100 ml sânge. Valori mai mari apar la bătrâni în unele stări patologice cardiovasculare, nefrite, hipertiroidism etc.

Un consum zilnic de 15 mg de α-tocoferol este necesar spre a se menține constant conținutul acestei vitamine în sângele omului adult. Un consum echilibrat în alimente asigură aceste necesități. Nevoile organismului pentru tocoferoli cresc dacă hrana are un conținut ridicat de acizi grași nesaturați. În condițiile unui conținut scăzut a tocoferolilor din hrană sau a intensificării catabolismului acestora, va determina după o anumită perioadă apariția hipovitaminozei E. Unii autori consideră concentrația normală a tocoferolilor din sânge între 0,7 și 1,6 mg/100 ml. Valori mai mici de 0,4 mg/100 ml sânge determină o deficiență a tocoferolilor. Scăderea conținutului tocoferolilor din plasmă este însoțită frecvent de o scădere a rezistenței osmotice a eritrocitelor la acțiunea oxidanților, în special a apei oxigenate și a acidului dialuric. În cazuri mai severe, reducerea rezistenței eritrocitelor atinge proporții de 100%, cu degradarea totală a eritrocitelor. Acest fenomen stă la baza testului de hemoliză eritrocitară, care este un test utilizat și în detectarea stărilor de hipovitaminoză E. Trebuie reținut că reducerea marcantă a rezistenței osmotice a eritrocitelor apare numai după ce conținutul tocoferolilor a scăzut sub 0,4 mg/100 ml sânge. Hemoliza eritrocitelor până la 10% este apreciată a se realiza în limite normale, iar dacă procentul eritrocitelor hemolizate depășește 25%, indică o stare carențială accentuată a tocoferolilor.

Scanned with OKEN Scanner

Tocoferolii administrați oral în doze normale, sunt în general bine absorbiți. Ei sunt transportați în plasmă sub formă de tocoferoli liberi cuplați cu β-lipoproteine. Cantitatea de tocoferoli excretați prin bilă este relativ mică. Dacă se administrează cantități mari de tocoferoli, în urina oamenilor se vor identifica metaboliți chinonici ai tocoferolilor ca de exemplu 2-(3-hidroxi-3-metil-5-carboxipentil)-3,5,6-trimetilhidrochinonă și γ-lactona sa, identificați prima dată de *E. J. Simon* și colab., în 1956.

La iepure proporția acestor metaboliți în urină reprezintă 20—30%, la un dozaj intravenos al tocoferolilor.

La păsări și la animalele de fermă există o relație direct proporțională între conținutul tocoferolilor absorbiți și nivelul acestora în ficat și plasmă. La găini absorbția tocoferolilor se face cu aceeași eficiență atât în stare liberă cât și sub formă de esteri, dacă activitatea lor biologică este egală cu 1 ξ UI. Ouăle au un conținut relativ ridicat de tocoferoli. Ouăle de găină conțin în jur de 2 mg%, din care 85% este α-tocoferol. Dacă în hrana găinilor s-a adăugat săptămânal 100—200 mg de tocoferoli, după o anumită perioadă, conținutul tocoferolilor din ouă a variat între 16,5—21,35%.

În cazul porcinelor furajate cu o hrană săracă în tocoferoli, aceștia nu s-au găsit în plasmă ci numai în sângele total, la un nivel de 0,087 mg/100 ml sânge. Când plasma porcinelor conține 0,67 mg/100 ml tocoferoli, în sângele total s-au găsit 0,73 mg/100 ml.

Prin experiențe pe șobolani, s-a remarcat că eritrocitele din sângele acestora fac rezerve de tocoferoli. În serul și eritrocitele șobolanilor sugari s-a identificat numai α-tocoferol, în timp ce la șobolanul adult sunt prezenți β, γ și δ-tocoferolii. Dacă se administrează în hrana șobolanilor 2 g de tocoferoli se remarcă un conținut mai mare în sânge a tocoferolilor absorbiți în stare liberă decât sub formă de ester. Adăugarea uleiului de pește în hrana cu conținut scăzut de tocoferoli, are ca efect scăderea conținutului tocoferolilor din sânge și apariția distrofiei musculare la iepuri, oi, șoareci și bovine (ENESCU, 1990). *H. Dag* a stabilit în 1969 că la șobolanii hrăniți cu cantități mari de acizi grași nesaturați existenți în grăsimea alimentară, procesele de distrofie musculară erau mai precoce și mai accentuate. Dacă se adaugă ulei din ficat de pește în hrana șobolanilor, în proporție de 10% se produce o distrofie musculară gravă. Dacă uleiul de pește se adaugă în proporția de 80%, apar paralizii severe și un procent ridicat de cazuri mortale.

La animale, tocoferolemia variază destul de mult în raport cu specia, sexul, vârsta și alimentația. Astfel la porci variază între 0,60—0,70 mg/100 ml sânge, la viețiii nou-născuți tocoferolemia este în jur de 0,04 mg/100 ml, la miei 0,02 mg/100 ml, la oile adulte 0,33, la cai între 0,10—0,70 mg/100 ml, la vaci 0,10—0,20 mg%, la câini 0,80—100 mg% la 100 ml sânge. Conținutul tocoferolilor din sânge scade concomitent cu îmbătrânirea animalelor. În perioada de pășunat, animalele de fermă au un conținut mai ridicat de tocoferoli în sânge decât în perioada stabulației. La iepure, după o injectare intravenoasă de α-tocoferol, acesta s-a eliminat 67% prin fecale și 33% pri urină. Ca metabolit în urină s-a identificat glucuronidlactona: 2(3-hidroxi-3-metil-5-carboxi-pentil)-3,5,6-trimetilbenzochinona, care s-a identificat și în urina oamenilor. Formula structurală a acestui metabolit se prezintă în figura 4.12.

Scanned with OKEN Scanner

4.7. ROL ŞI ACŢIUNE BIOLOGICĂ

Pe lângă acţiunea specifică pe care o au tocoferolii asupra fecundităţii, ei au un rol însemnat şi în procesele de oxidoreducere asigurând protecţia a numeroase substanţe biologice active de degradare oxidative. Tocoferolii favorizează reacţiile de fosforinare şi formarea compuşilor macroergici. În lipsa sau insuficienţa tocoferolilor din hrană apar leziuni la nivelul aparatului genital masculin şi feminin, precum şi simptome de distrofie musculară şi necroza ficatului. Tocoferolii intervin în procesul de fertilitate influenţând la masculi formarea spermatoizilor, iar la femele buna desfăşurare a procesului de gestaţie. La masculi, carenţa de tocoferoli determină pierderea mobilităţii spermatozoizilor şi apariţia unor tulburări ireversibile ale epiteliilor tubilor seminiferi, care afectează spermatogeneza. La femele, lipsa tocoferolilor din hrană nu influenţează fecundaţia, care se produce normal, dar embrionul se dezvoltă numai o perioadă scurtă, pentru că nu după mult timp să intervină moartea acestuia şi să fie resorbit. Irigarea placentei cu sânge este defectuoasă din cauza unor leziuni vasculare importante, astfel încât embrionul moare prin asfixie. Toate aceste dereglări care apar la nivelul organelor genitale se pot vindeca prin tratament cu tocoferoli.

Iepurii trataţi cu doze mari de tocoferoli ajung la o maturitate sexuală cu mult mai repede decât lotul martor. Rezultate similare s-au observat şi la şobolani. Ca mecanism, tocoferolii intervin prin hormonii corticosuprarenali în special a ICSH şi FSH, a căror secreţie o stimulează.

În stări carenţiale ale tocoferolilor apar numeroase distrofii musculare, a căror intensitate variază cu specia şi vârsta animalelor. Apar de asemenea tulburări la nivelul ficatului şi al glandelor suprarenale. În ficat apare o steatoză care predomină în lobul central, iar celulele hepatice steatozate au un conţinut redus de glicogen şi de ribonucleoproteine. Glandele suprarenale se hipertrofiază, cu repecusiuni hormonale negative însemnate. Tot în carenţele tocoferolilor apar la animale leziuni mai mult sau mai puţin specifice, care afectează muşchii striaţi şi cei netezi, pereţii vasculari, ţesuturile colagene şi cele adipoase etc. La puii de găină apare diateza exudativă, caracterizată printr-o hemoragie slabă, iar într-un stadiu mai avansat de avitaminoză apare encefalomalacia, care se manifestă prin spasme şi paralizii, provocate de o hemoragie difuză în creier (OERIU, 1974).

Tocoferolii influenţează biosinteza proteinelor şi protejează grăsimile împotriva oxidării. Puterea vitaminică a tocoferolilor este în raport invers cu puterea lor antioxidantă. Prin transformarea reversibilă a hidroxilului de la C-6, în grupare cetonică, tocoferolii funcţionează în organism ca importante sisteme redox, contribuind la transportul hidrogenului pe cale neenzimatică. Ei protejează organismele indirect împotriva infecţiilor, mărind rezistenţa celulelor împotriva microorganismelor patogene.

Dintre simptomele mai caracteristice care apar în stările carenţiale ale tocoferolilor se remarcă o scădere accentuată a conţinutului creatinei din muşchii striaţi şi intensificarea eliminării acesteia prin urină. Tocoferolii influenţează metabolismul aminoacizilor şi ţesuturile cu pro-

Scanned with OKEN Scanner

liferare celulară intensă, fapt pentru care se fac tratamente cu aceste vitamine în clinică pentru stimularea creșterii copiilor imaturi și pentru vindecarea rănilor. Ei protejează enzimele celulare prin prevenirea formării peroxizilor la nivelul acizilor grași nesaturați, care inhibă activitatea enzimelor. În stări carențiale ale tocoferolilor se remarcă o dereglare a incorporării fosforului în acizii nucleici. Tocoferolii au de asemenea un rol însemnat în funcționarea normală a oxidării fosforolitice implicată în procesul de respirație.

În avitaminoze E apar de asemenea leziuni la nivelul celulelor nervoase, distrofii musculare cu creșterea însemnată a consumului de oxigen, tulburări ale hipofizei și tiroidei.

La iepuri, administrarea în hrană a unor doze mari de tocoferoli, determină o creștere semnificativă a activității tiroidei. Prin experiențe pe cobai s-a constatat că în celulele miocardului scade concentrația ionilor de sodiu după extirparea glandei tiroide, în raport cu lotul martor. Tratamentul cu tocoferoli mărește simțitor toleranța cobailor la acțiunea glicozidelor cardiotonice, în special a digitalinei și strofantinei. Tocoferolii au fost folosiți cu succes la o dozare medie de 200 mg la numeroși pacienți pentru vindecarea intoxicațiilor provocate de conținutul ridicat de digitalină. Multe dintre efectele metabolice ale tocoferolilor se bazează pe proprietățile lor antioxidante. Ele protejează în organism activitatea altor vitamine (A, D, F, B_1, C etc.), a numeroși hormoni, enzime și a grăsimilor de peroxizii acizilor grași nesaturați. Experimental s-a demonstrat că la șobolanii cu deficiențe în tocoferoli în organism, după sacrificarea animalelor, se produce o rapidă râncezire a grăsimilor sub acțiunea oxigenului atmosferic, ceea ce nu se întâmplă cu grăsimea animalelor hrănite cu doze mari de tocoferoli.

Tocoferolii contracarează degradările provocate de acțiunea oxigenului molecular, deoarece au un potențial redox mai mic și de asemenea prin împiedicarea formării peroxizilor, care au o acțiune oxidantă puternică. Mecanismul de acțiune a tocoferolilor în procesul de respirație rămâne încă neelucidat. În conformitate cu cercetările mai recente, rolul de transportori de electroni atribuit tocoferolilor în procesul de respirație trebuie atribuit ubichinonelor, în timp ce tocoferolii apără ubichinonele împotriva agenților oxidanți (ZAESLEIN, 1982)

În stări carențiale ale tocoferolilor se remarcă o depunere a pigmenților liposolubili în țesuturile adipoase ale copiilor, precum și depozitarea lipoperoxizilor în țesuturi, creșterea creatininei, reducerea rezistenței osmotice a eritrocitelor etc. Hipovitaminozele tocoferolilor sunt ades deteminate de dereglarea procesului de absorbție care se produce frecvent în pancreatite, dereglări hepatice, operații ale stomacului, hrană bogată în acizi grași nesaturați și o hipo-β-lipoproteinemie.

4.7.1. EFECTUL ANTIOXIGEN

Întrucât tocoferolii au o mare capacitate de a fixa oxigenul ei manifestă atât „in vivo" cât și „in vitro" importante efecte antioxigen, de protejare a diferiților compuși de degradările produse prin oxidarea acestora. Grăsimile care nu conțin tocoferoli, în prezența oxigenului suferă un proces rapid de râncezire, apreciat prin cantitatea de O_2 fixată de grăsimi. În prezența tocoferolilor râncezirea grăsimilor este

Scanned with OKEN Scanner

mult redusă deoarece oxigenul se va combina prima dată cu tocoferolii, având o mare afinitate față de aceste vitamine și numai după oxidarea acestora, se va intensifica procesul de râncezire al grăsimilor. Dintre antioxidanții sinergici cu tocoferolii fac parte vitamina C și acidul citric, care servesc ca sursă de hidrogen, contribuind la regenerarea tocoferolilor. Dintre antioxidanții sinergici ai tocoferolilor obținuți prin sinteză, face parte și acidul norhidroguaiaretic, antioxidant industrial care protejează animalele față de diateza exudativă. Antabusul (bis-dietiltiocarbamil-disulfura) se utilizează în cura de dezintoxicare alcoolică. El protejează șobolanii de „îmbrunarea grăsimilor" și puii de găină față de diateza exudativă. Albastru de metilen (clorura de metil-thionină) protejează animalele carențate în tocoferoli de depleția vitaminei A din ficat, de peroxidarea grăsimilor, de hemoliza eritrocitelor, față de diateza exsudativă, encefalomalacie și de tulburări de sterilitate, dar este fără efect asupra distrofiei musculare (BEDELEANU, 1985).

Pentru ca tocoferolii să funcționeze ca antioxidanți este necesar ca gruparea hidroxilică de la C-6 să fie liberă. Pentru activitatea vitaminică a tocoferolilor, această grupare se poate găsi și sub formă de ester, care mărește stabilitatea în timp a acestor vitamine. Datorită caracterului antioxidant al tocoferolilor asupra grăsimilor se realizează „in vivo" o stabilizare și o depozitare mai eficientă a acestora, iar „in vitro" se asigură o bună conservare a uleiurilor și grăsimilor.

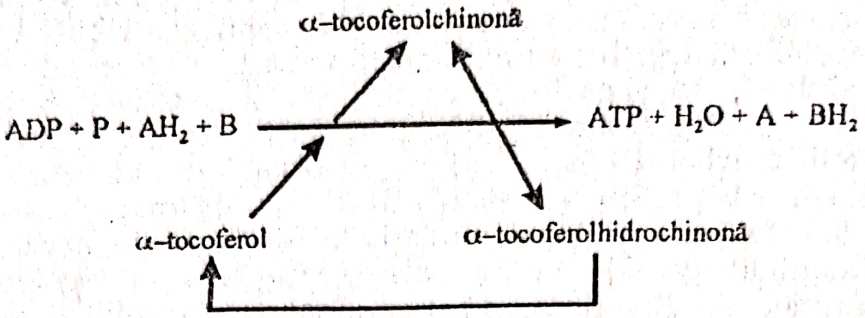
Tocoferolii prezintă o mare eficiență în protecția vitaminelor A și a carotenoidelor de degradări oxidative. S-a constatat de asemenea o dependență între tocoferoli și activitatea hormonală a hipofizei anterioare. Datorită proprietăților antioxidante, tocoferolii protejează globulele roșii împotriva hemolizei acestora, provocată de diferite substanțe oxidante. Experimental s-a demonstrat că atunci când tocoferolemia este mai mare de 0,5 mg%, hemoliza nu a depășit limitele normale de 10—12%, dar pe măsură ce se produce scăderea conținutului tocoferilor din sânge, concomitent crește numărul eritrocitelor hemolizate, apropiindu-se de 100% și implicit moartea animalelor. Unii cercetători susțin că în celule funcția principală a tocoferolilor este cea antioxidantă, fapt pentru care fac parte din grupa factorilor de creștere, alături de retinoli, estrogeni etc. În mușchii carențați în tocoferoli crește conținutul peroxizilor acizilor grași nesaturați, fapt ce explică rolul protector al tocoferolilor asupra acizilor grași nesaturați din membranele celulare. Ei au de asemenea un rol protector datorită caracterului antioxidant în neuroviroze.

4.7.2. ROLUL TOCOFEROLILOR ÎN OXIDOREDUCERILE CELULARE

Tocoferolii localizați în mitocondrii au un rol important în procesul de respirație, în special în cuplarea oxidărilor celulare cu procesul de fosforilare, astfel încât energia care rezultă din procesele de oxidare să fie captată și înmagazinată în compușii macroergici, preponderent în ADP și ATP. Acțiunea inhibitoare a α-tocoferolului în oxidările celulare s-a pus în evidență prin decuplarea oxidării de fosforilare cu ajutorul dinitrofenolilor. Experimental s-a dovedit că α-tocoferolul este un reglator între fosforilarea oxidativă și catena respiratorie, care

Scanned with OKEN Scanner

concură între ele și se inhibă reciproc. Acțiunea tocoferolilor în fosforilarea oxidativă din lanțul respirator celular, se prezintă după ENESCU (1990), astfel:



P = anion fosfat; AH_2 = donor de hidrogen ce se oxidează;
B = acceptor de hidrogen care se reduce

Unii cercetători *(W. Nason, A. Lehman)* au arătat că α-tocoferolul ia parte la oxidarea enzimatică a nucleotidelor pirimidinice, realizând transferul de electroni între citocromul b și citocromul c. NADH → flavină → cit. b $\xrightarrow{\text{tocoferoli}}$ cit. c → etc.

Pe baza cercetărilor mai recente s-a stabilit că factorul liposolubil transportor de electroni în procesul oxidării terminale este îndeplinit de ubichinona-10 și nu de vitamina E. Tocoferolii ajută la stabilizarea coenzimei Q cu rol în respirația tisulară. În carență de tocoferoli, timp de 4 luni, conținutul ubichinonei nu s-a modificat, nefiind dependentă de starea carențială a tocoferolilor. Tocoferolii sunt implicați în sistemul enzimelor respiratorii (în NADH-citocrom-C-reductază), iar în prezența lor se realizează cuplarea oxidării cu fosforilarea, deci realizarea oxidării fosforolitice. În lipsa lor se produce o creștere a oxidărilor mitocondriale, fără înmagazinarea energiei în ATP. În aceste procese α-tocoferolul se oxidează în α-tocoferolchinonă care prin reducere se transformă în α-tocoferolhidrochinonă, ce va servi ca substrat pentru refacerea α-tocoferolului. Tocoferolii au capacitatea de a proteja sistemul mitocondrial, sediul reacțiilor ce au loc în procesul de respirație, de degradări oxidative ireversibile de către peroxizii lipidici și alți oxidanți puternici. În preparate mitocondriale, preluate de la animale carențate în tocoferoli, s-a produs o intensă degradare a activității mitocondriilor „in vitro", datorită hematin-peroxidazei care a acționat asupra acizilor grași nesaturați existenți în aceste particole. Adăugarea de α-tocoferol în proba martor a împiedicat degradarea activității mitocondriilor prin caracterul lor antioxidant, împiedicând formarea peroxizilor.

4.7.3. ROLUL TOCOFEROLILOR ÎN METABOLISMUL ȚESUTULUI MUSCULAR

În mușchi, tocoferolii iau parte în oxidări, inclusiv în fosforilarea oxidativă, în metabolismul creatinei cu formarea fosfagenului (compus macroergic al fosfocreatinei) etc. În stări de avitaminoză E, mușchiul devine incapabil de a transforma creatina în fosfagen, fapt ce determină o scădere a creatinei din mușchi, concomitent cu intensificarea

eliminării acesteia prin urină. Creşterea raportului creatină/creatinină urinară este un indicator biochimic însemnat în stabilirea carenţei tocoferolilor, care precede manifestările clinice. O semnificaţie similară o are şi apariţia pentozuriei, în special apariţia ribozofosfatului în urină (BEDELEANU, 1985).

În stări de avitaminoză E se produce o distrofie musculară, o degradare a muşchilor striaţi, scăderea glutamicooxalaceticotransaminazei (GOT) din muşchi dar nu şi din ser. Sunt afectate mitocondriile şi se produce o mărire a permeabilităţii lizozomilor, cu eliberarea hidrolazelor acide. Se produce o alterare a muşchiului inimii, care poate provoca moartea animalelor supuse experimentării (cobai, iepuri, şobolani), prin insuficienţa miocardului. În avitaminoza E se produce de asemenea degradarea ţesutului conjunctiv, afectarea fibrelor de colagen şi ale substanţei fundamentale. Se produce o creştere a permeabilităţii vaselor de sânge, fapt pentru care tocoferolii sunt utilizaţi în tratamentul profilactice ale bolilor cardiovasculare. Tocoferolii au un rol complex în biochimismul ţesutului muscular.

Distrofia musculară se datoreşte hidrolizei proteinelor musculare, datorită activităţii mărite a proteazelor din muşchi. Aceste dereglări ale proteinelor conduc la apariţia aminoaciduriei şi a alantoinuriei. Distrofia musculară precoce apare la copii cu malnutriţie severă şi la adulţi cu maladii cronice.

4.7.4. ROLUL TOCOFEROLILOR ASUPRA ERITROCITELOR

La primate, în stări carenţiale ale tocoferolilor, după distrofia musculară apare anemia macrocitară, care cedează la tratamentul cu α-tocoferol. La om şi maimuţă, în avitaminoza E, semidurata vieţii eritrocitelor este jumătate faţă de timpul normal. De asemenea, se remarcă o corelaţie strânsă între conţinutul tocoferolilor din sânge şi stabilitatea eritrocitelor. Experimental s-a demonstrat că la o tocoferolemie normală de peste 0,5 mg%, hemoliza produsă de H_2O_2 (0,12 vol%), nu depăşeşte 10%. În stări carenţiale, cu tocoferolemia de 0,2—0,3 mg%, gradul hemolizei depăşeşte 50%, iar dacă se menţine starea carenţială un timp mai îndelungat, hemoliza eritrocitelor atinge valori de 100%.

La nou-născuţii subponderali, hrăniţi artificial, cu aport insuficient de tocoferoli, scade mult nivelul tocoferolemiei, apare anemie reticulocitară, edem şi tulburări ale pielii, timpul de viaţă scăzut al eritrocitelor, fenomene care cedează prin administrarea zilnică a 75—100 UI de α-tocoferol.

Degradarea eritrocitelor se datoreşte în primul rând prezenţei peroxizilor, formaţi la nivelul acizilor graşi polietenici din stroma lipoproteică a hematiilor, sub influenţa oxidantă a hemoglobinei, scăzând astfel rezistenţa eritrocitelor la desfacerea legăturilor chimice. Rezistenţa eritrocitelor la hemoliză depinde şi de capacitatea de apărare a acestora, prin intermediul catalazei. Prin inactivarea catalazei, incubând eritrocitele cu 2,4-diclorfenol, timp de 60 minute, se suprimă rezistenţa la hemoliză, în soluţii diluate de H_2O_2, iar prin adăugarea catalazei pure se suprimă efectul hemolizant al apei oxigenate.

Intensitatea hemolizei eritrocitelor la prematuri şi nou-născuţi variază invers proporţional cu conţinutul catalazei eritrocitare. Alte ex-

Scanned with OKEN Scanner

perienţe efectuate „in vitro" cu măduvă din şira spinării recoltată de la maimuţe cu regim normal de hrană (lot martor) şi maimuţe carenţate în tocoferoli, au demonstrat că formarea acidului δ-aminolevulinic, care contribuie la biosinteza porfirinelor, are un conţinut de 6 ori mai mic la lotul experimental faţă de lotul martor. Vitaminele E nu influenţează direct formarea eritrocitelor, ci indirect, prin intermediul enzimelor, care catalizează aceste procese.

4.7.5. ROLUL TOCOFEROLILOR ÎN METABOLISMUL INTERMEDIAR

Tocoferolii intervin în metabolismul aminoacizilor, acizilor graşi nesaturaţi, a glucidelor, acizilor nucleici şi a altor substanţe. Administrarea unor doze mari de α-tocoferol la şobolani, asociată cu o hrană săracă în proteine, împiedică apariţia simptomelor care apar în cazul proteinemiei scăzute. Tocoferolii măresc permeabilitatea membranelor celulare şi permeabilitatea capilară pentru ionii Na^+, K^+, Ca^{2+}, Mg^{2+}, NO_3^{1-}, Cl^-, SO_4^{2-} şi pentru unii compuşi organici (ATP, unii aminoacizi, monoglucide fosforilate, acidul creatin fosforic etc.). Tocoferolii intervin de asemenea în metabolismul acizilor nucleici. Pe cale experimentală, folosind diferite animale (cobai, şobolani, iepuri), s-a arătat că în carenţă de tocoferoli, se intensifică în muşchi şi în măduva spinării, biosinteza şi degradarea accentuată a acidului dezoxiribonucleic, iar în urina animalelor apar fosfaţi de dezoxiriboză, ribofosfaţi şi alantoină, care provin prin catabolizarea acizilor nucleici.

Şobolanii supuşi unui regim alimentar carenţat în proteine, în special în aminoacizi, cisteină, cistină şi metionină, manifestă o necroză hepatică intensă. Leziunile hepatice în avitaminoza E apar brusc, dar numai după o perioadă de latenţă de aproximativ 45 de zile. Tratamentul cu α-tocoferoli în amestec cu compuşi selenici în doze sporite, vindecă leziunile hepatice. Se pare că tocoferolii şi seleniu, care poate înlocui parţial vitaminele E în stări carenţiale, au ca acţiune comună protecţia antioxidantă a ubichinonei, care are un rol însemnat în oxidoreducerile celulare.

În stări carenţiale ale tocoferolilor apar o serie de pigmenţi anormali, concomitent cu creşterea indicelui de peroxizi din ţesutul sau organul respectiv. În muşchii scheletici şi în muşchiul inimii se formează un pigment galben-brun (anormal) care imprimă muşchilor o culoare brun-închis, cu fluorescenţă în lumină ultravioletă. Apariţia acestui pigment este un indiciu în ce priveşte apariţia procesului de degradare a miofibrilelor. La animalele carenţate în vitamina E, supuse unui regim alimentar bogat în acizi graşi nesaturaţi, ţesutul adipos primeşte o culoare galben-brună, corelată cu creşterea peroxizilor. Pigmentul galben-brun constituit dintr-o componentă liposolubilă şi una hidrosolubilă, se colorează puternic cu fuxina, pare a fi identic cu „ceroidul" din ficatul şobolanilor hrăniţi cu o dietă bogată în acizi graşi esenţiali.

4.7.6. INTERACŢIUNEA TOCOFEROLILOR CU ALTE VITAMINE ŞI CU ENZIME

Tocoferolii au cu vitaminele A efecte atât favorabile cât şi nefavorabile asupra organismului. Astfel, în stări carenţiale de vitamină E, dozele mari de vitamină A (240 mg/kg greutate corp) asigură creşterea,

Scanned with OKEN Scanner

dar nu corectează hipotocoferolemia. Dacă se administrează cantități sporite de retinoli se produce o scădere a rezervelor de tocoferoli din țesuturi și implicit apare hipovitaminoza E. În hipovitaminoza A apare o creștere a necesităților în tocoferoli, care protejează vitamina A atât „in vitro", cât și în organism. În carența tocoferolilor, conținutul vitaminei A din ficat este mult scăzut.

Între acțiunea vitaminelor E, A și F există multe implicații sinergice în diferite procese metabolice.

Dozele mari de tocoferoli scad în mod accentuat conținutul vitaminei B_1 din ficatul uman. La șobolani, tratamentele cu vitamina B_1 vindecă distrofia musculară apărută în hipovitaminoza E. Șobolanii cu carență în tocoferoli necesită un consum sporit de vitamina B_1. La șoarecii carențați în vitamina E, administrarea de vitamina B_6 determină o creștere a acestora în greutate.

Vitaminele C și E au o acțiune antioxidantă reciprocă, de protecție a uneia față de cealaltă. Regenerarea hemoglobinei la animalele anemiate este maximă prin administrarea simultană a vitaminelor E, C și a fierului, față de administrarea separată a acestor factori.

În stări carențiale ale vitaminelor E, se intensifică activitatea enzimelor care influențează catabolismul acizilor nucleici.

ENESCU și colab. (1990) menționează că extractele cu izooctani din mușchiul scheletic al șobolanilor inhibă activitatea NADPH-oxidazei și a $NADPH^+$-citocrom-reductazei, iar dacă se adaugă o soluție de α-tocoferol 10^{-5} moli, inhibarea enzimelor încetează. În carența tocoferolilor se mărește permeabilitatea membranei lizozomilor, cu eliberarea de hidrolaze acide, care intensifică procesul de distrofie musculară. Este îngreunat de asemenea procesul de incorporare a fosforului în acizii nucleici, cu repercursiuni negative asupra biosintezei proteinelor.

Tocoferolii influențează favorabil biosinteza enzimelor cu structură heminică cum sunt catalaza, peroxidaza, triptofanpirolaza, citocromul b_5, aminoacid-deshidrataza, enzime importante în biosinteza hemului și în hematopoieză. O doză sporită de tocoferoli de peste 12 mg/kg corp, determină la bărbați o scădere accentuată a cocarboxilazei sanguine.

4.8. HIPO- ȘI HIPERVITAMINOZE E

O bună parte din afecțiunile care apar în stări de hipovitaminoză s-au prezentat în subcapitolul anterior, privind rolul și activitatea biologică a tocoferolilor.

În stări carențiale ale tocoferolilor este diminuată activitatea hipofizei, cu reducerea secreției de hormoni gonadotropi, care influențează procesele de reproducere. Este diminuat procesul de biosinteză a acizilor nucleici, se produce degradarea membranelor celulare datorită acțiunii peroxizilor care se formează la nivelul acizilor grași nesaturați. Apare diateza exsudativă, dereglări ale țesutului muscular și adipos, hemoragii, hemoliza globulelor roșii, formarea de pigmenți anormali. La șobolan, în hipovitaminoza E apare o distrofie accentuată a mușchiului striat, urmată de scăderea creatinei, creșterea clorurilor și a apei în mușchi, apar tulburări la nivelul organelor de reproducere la ambele sexe. La păsări în stări de avitaminoză mai accentuată apar le-

Scanned with OKEN Scanner

ziuni la nivelul sistemului nervos, cu leziuni encefalice pronunțate (encefalomalacia). La oameni în stări de hipovitaminoză E se produce uneori o scleroză a măduvei spinării în regiunea lombară, cu tulburări de pareză ale picioarelor. În creier apar focare de ramolisment și hemoragie. Sistemul osos prezintă decalcifieri la nivelul cutiei craniene și a scheletului. În ficat apar necroze și depunerea unui pigment anormal acido-rezistent. Paralel cu pigmentarea ficatului și a altor organe și țesuturi, crește indicele de peroxizi din grăsimi, ca urmare a formării peroxizilor la nivelul acizilor grași nesaturați. Primul simptom mai caracteristic care apare la om în avitaminoza E îl constituie distrugerea globulelor roșii, ca urmare a fragilității lor. Se produce de asemenea o reducere a stabilității membranelor și sărăcirea în colagen a țesutului conjunctiv. Apar distrofii musculare, depozitări anormale de grăsimi, reducerea activității glandelor suprarenale și a hipofizei. Cu toate că unii autori nu prezintă dovezi certe cu privire la rolul tocoferolilor în fertilitatea la om, în stări carențiale prelungite are loc și o degenerare a tubilor seminiferi din testicule, ceea ce conduce la sterilitate. La femeile gravide în stări de avitaminoză E sunt frecvente nașterile premature, iar la copiii nou-născuți apar anemii hemoragice. În stări carențiale ale tocoferolilor apar frecvent boli cardiovasculare și hepatice, artero-scleroză și chiar boli neoplazice.

La primate și la om tocoferolemia scăzută are repercusiuni negative atât asupra musculaturii, cât și asupra hematopoiezei și a vitalității eritrocitelor. La maimuțe, în hipovitaminoza E, apare la început distrofia musculară, urmată de o anemie de tip macrocitar, care este un simptom cert și constant în stări carențiale ale tocoferolilor. Durata vieții eritrocitelor la maimuțele aflate în stare de hipovitaminoză E este mai scurtă cu 30—50% față de lotul martor. Hematiile provenite de la animale carențate în tocoferol sunt ușor lizate „in vitro" de aloxan, acid diaberic, sau apă oxigenată, în timp ce hematiile provenite de la animale necarențate nu suferă această liză. În stări carențiale crește conținutul peroxizilor din sânge, concomitent cu scăderea cantității de catalază eritrocitară, fapt ce determină o micșorare a rezistenței hematiilor la liză. Tulburările hematopoietice care apar în stări de hipovitaminoză E se datoresc perturbării biosintezei acizilor nucleici și a substanțelor proteice.

În stări de hipovitaminoză E apar la unele animale (cobai, șobolan, porci, bovine, cabaline, oi, câine etc.) dereglări la organele genitale, care afectează procesul de reproducere. La masculi apare o degenerare a testiculelor, cu leziuni ireversibile la nivelul tubilor seminiferi, fapt ce afectează spermatogeneza și mobilitatea spermatozoizilor. La femele este dereglat procesul de gestație, caracterizat prin incapacitatea de a purta sarcina la termen, în majoritatea cazurilor survine moartea și resorbția embrionului. Musculatura netedă din uter se dereglează, apar granulații galben-brune și chisturi ovariene. Apar frecvent hemoragii placentare în secrețiile vaginale, la începutul graviditații. La șobolance, în a 12—14 zi sau chiar mai târziu de la fecundare, se produce lent resorbția fătului, care moare datorită asfixiei și lipsei de hrană.

În oul de găină cu carență în tocoferoli, embrionul se dezvoltă lent în hipovitaminoză E și moare spre sfârșitul primei săptămâni.

Scanned with OKEN Scanner

La animalele hipofizectomizate, tocoferolii nu au nici o influență asupra organelor genitale, fapt ce constituie un argument însemnat că vitaminele E acționează prin intermediul hipofizei asupra celorlalte glande endocrine din organism. Tocoferolii protejează de oxidare hormonii gonadotropi (testosteron, progesteron etc.) tireotropi și galactotropi. La animalele în stare de hipovitaminoză E, glandele corticosuprarenale sunt involuate, iar timusul este mult mărit. Apar de asemenea leziuni la nivelul sistemului cardio-vascular, care se manifestă prin insuficiență cardiacă, cardiopatie ischemică, tulburări ale circulației centrale și periferice. La rinichi apare o dereglare a tubilor contorți, apariția de calculi renali. Este lezat și organismul auditiv. Se calcifică labirintul și apar simptome de hipoacuzie, care pot evolua până la instalarea surdității totale.

Dacă șobolancele hrănite o perioadă îndelungată în carență de tocoferoli, sunt împerecheate cu masculi normali, o parte din pui se nasc morți, iar ceilalți vor muri la scurt timp de la naștere. Continuarea stării carențiale duce la agravarea unor leziuni care apar la diferite organe, iar pe lângă sterilitate, care devine ireversibilă, apar tulburări nervoase grave, care pot duce la moartea organismului. Unele albine hrănite cu tocoferoli devin matcă.

Hiperoitaminoze. E. Excesul de tocoferoli din hrana animalelor de experiență administrată o perioadă mai îndelungată, determină instalarea stării de hipervitaminoză E, care provoacă tulburări nervoase, insomnii, dureri ale membrelor inferioare, involuția ovarelor, tulburări ale ciclului estral, azoospermie etc.

Hipervitaminoza se instalează experimental la animale la o administrare zilnică de 150—200 mg α-tocoferol, timp îndelungat. Administrarea unor doze mari de vitamina E, are ca efect creșterea rezervei de vitamină A din ficat de la 124 μg/g țesut uscat, la 172 μg/g. În general, tocoferolii din hrană influențează favorabil creșterea conținutului vitaminei A din ficat. Tratamentele cu tocoferoli se utilizează la oameni în afecțiuni ginecologice și obstetrice cum sunt tulburări de menopauză, sterilitate, iminență de avort, în toxicoze la gravide, îngrijirea prematurilor, amenoree. La bărbați în cazul oligospermiei, azoospermiei, sterilitate, în afecțiuni dermatologice, în prevenirea și terapia bolilor cardio-vasculare, în leziunile hepatice cronice, distrofii musculare etc. Cu toate că dozele de 100 mg tocoferoli date zilnic la omul adult nu sunt toxice, adminitsrate o perioadă îndelungată duc la tulburări ale procesului de reproducere, afecțiuni musculare și nervoase, dureri ale membrelor inferioare, fenomene toxice, azoospermie la bărbați etc.

Hrana naturală a omului și a animalelor, chiar dacă este mai bogată în tocoferoli, nu determină apariția unor hipervitaminoze E, întrucât o parte din tocoferoli sunt depozitați, iar cea mai mare parte se consumă în diferite procese metabolice.

Vitamina E este considerată a avea un nivel foarte înalt de toxicitate care apare la concentrații ridicate. Nu se prea întâlnesc la animale stări de hipervitaminoze E, decât cele provocate experimental. Doza de 800 mg/kg corp greutate, administrate zilnic 5 luni, au fost tolerate de omul adult, fără reacții negative. *R. W. Hillman* (1957) a raportat că un voluntar a luat în total 296 g de αtocoferol timp de 93 de zile, fără să apară simptome de intoxicare, cu excepția creșterii

Scanned with OKEN Scanner

creatininei. Dozele mari de tocoferoli aplicate intramuscular cauzează iritații locale. Dozele de tocoferoli care cauzează intoxicații acute, cu DL_{50}, exprimate în mg/kg corp, administrate oral, sunt de 50 000 la șoareci, 5 000 la șobolan, 2 000 la iepure, 200 la pisică, 320 la câine, 200 la măgar și la broască. Dozele subtoxice, administrate în mg/kg greutate corp sunt de 25 000 la șoareci timp de 10 zile, 1 000 la șobolan timp de 10 zile sau de 130 timp de 60 de zile, 100 la pisică și câine timp de 10 zile, 2 000 la porumbei timp de 10 zile.

Tocoferolii sunt bine tolerați de animalele supuse experimentării, la doze mari pe perioade îndelungate, fără reacții negative.

4.9. ANTIVITAMINE E

Nu s-au identificat până în prezent antivitamine „clasice" care să inhibe activitatea tocoferolilor pe baza analogiei lor structurale. Antivitaminele E cunoscute până în prezent sunt substanțe care provoacă la animale simptome similare cu cele care apar în stările de hipovitaminoză E.

Acizii grași nesaturați și derivați de di- sau tri-crezoli, acționează ca antagoniști ai tocoferolilor. Ei nu au o structură analogă tocoferolilor, nu intră în competiție cu aceștia și nu pot fi considerate ca antivitamine propriu-zise. Cu toate acestea, întrucât determină o scădere a conținutului tocoferolilor din diferite țesuturi și sânge, sunt considerate de unii autori antivitamine E.

Dintre substanțele care acționează similar cu carența de tocoferoli la animale, sunt α-tocoferol-acetatul, tricrezilfosfatul de 3,5-milenolul, care acționează prin efecte, toxice care conduc la o deficiență de tocoferoli. Dintre alte substanțe care provoacă la animalele de laborator simptome similare avitaminozei tocoferolilor fac parte și piridina $NaHSO_3$, acizi grași nesaturați, grăsimi ce conțin acizi grași nesaturați, tetraclorura de carbon etc.

Dintre substanțele cu acțiune vitaminică similară tocoferolilor fac parte diferite cumarine și cumarone, chinone și hidrochinone, alifenoli, esteri ai fenolilor și hidrochinonei. Esterii fosforici ai α-tocoferolului sunt mai activi decât αtocoferolul liber, fiind mai puțin sensibili în mediu acid. Tot în această grupă se pot aminti factorii care au o acțiune sinergică cu tocoferolii, cum sunt acizii fosforic, citric și piruvic, vitaminele A și C, fenolii, taninuri, fosfolipide etc.

Dintre antivitaminele E fac parte și grăsimile râncede care inactivează rapid acțiunea tocoferolilor. Dintre elementele care se găsesc în grăsimile râncede (alcooli, fenoli, aldehide, cetone) cu siguranță peroxizii și hidroperoxizii au un rol principal în inactivarea tocoferolilor.

4.10. TRATAMENTE CU TOCOFEROLI

În stări de hipovitaminoză E, la oamenii bolnavi care au consumat alimente cu conținut ridicat în acizi grași nesaturați, este indicat a li se administra doze mari de tocoferoli, zilnic între 100—200 mg, pentru a acoperi necesitățile organismului, înlăturându-se astfel starea ca-

Scanned with OKEN Scanner

renţială. La copii nou-născuţi cu o rată ridicată a hemolizei eritrocitare, trebuie să li se dea între 10 şi 50 mg α-tocoferol zilnic, în funcţie de gravitatea bolii. Pacienţii cu o β-lipoproteinemie scăzută necesită un tratament mai îndelungat cu tocoferoli, în doze de 100 mg/kg corp pe zi. În tratarea leziunilor vasculare şi a bolilor cardiovasculare se recomandă doze de 1.000 mg α-tocoferol pe zi, în tratamente profilactice.

În ţara noastră se foloseşte vitamina E sub formă de fiole care conţin acetat de α-tocoferol în diferite concentraţii. Există fiole de 1 ml soluţie uleioasă care conţin 30 mg sau 300 mg substanţă activă şi capsule gelatinoase moi, care conţin 100 mg acetat de α-tocoferol. Dintre preparatele farmaceutice mai noi ce conţin vitamina E menţionăm *Ephynalul,* folosit frecvent în tratamente profilactice şi curative în hipovitaminoza tocoferolilor. Acest preparat are un puternic caracter antioxidant, intervine în metabolismul intermediar a numeroşi compuşi, reduce necesităţile metabolice în oxigen, stimulează formarea ţesuturilor mezodermice, substanţele intercelulare, colagenul, vasele de sânge, ţesutul conjunctiv, muşchii striaţi şi netezi. Se foloseşte în tratarea anemiei, în creşterea copiilor imaturi etc.

Dintre alte produse farmaceutice în compoziţia cărora intră şi vitamina E fac parte *Mecopar forte, Polivitaminizant* S (30 mg), *Cavit* (9 tablete), *Viplex, Entrophyl* (Franţa), *Ipotensil* (Italia), *Tensiopres* şi *Vitapressina* (Italia).

Tocoferolii se folosesc în afecţiuni ginecologice, la avort spontan, iminenţă de avort, sterilitate, toxicoză gravidică, prurit vulvar, oligomenoree, miopie evolutivă etc. În asociere cu testosteronul se administrează bărbaţilor sterili, cu oligo- şi azocspermie. La femei α-tocoferolul se dă în ascciere cu progesteron şi testosteron în tulburări de menopauză. Tocoferolii se folosesc frecvent în tratarea flebitelor, arteritelor, în enurează, hepatită epidemică, reumatism muscular etc. In distrofii musculare comune, se administrează la oamenii adulţi per os 100—200 mg/zi. În afecţiuni neuromusculare se injectează (i.m.) 50 mg de α-tocoferol, din 2 în 2 zile, timp de 24 de zile. În psoriazis, se dau 3—4 capsule pe zi. În acnee şi scherodermie, câte 300 mg/zi, cură îndelungată. La sugari, în stări de avitaminoză E se injectează 15—30 mg de α-tocoferol, de două ori pe săptămână. La copii cu anemie, reticulocitoză, trombocitoză, se adaugă în hrană fier şi 75—100 mg de tocoferoli. Asocierea vitaminei E cu acidul ascorbic măreşte rezistenţa vaselor sanguine, fluxul sanguin, în prevenirea arteriosclerozei, micşorează conţinutul colesterolului din sânge şi depunerea acestuia pe vasele sanguine. Tocoferolii sunt folosiţi în terapia diabeticilor micşorând nivelul glicemiei, precum şi în vindecarea unor porfirii, în doze de 10—400 mg/zi.

Tocoferolii se folosesc de asemenea şi în tratarea intoxicaţiilor provocate de săruri de mercur şi glicozide cardiotonice. Ca antioxidanţi tocoferolii se folosesc în doze de maximum 2 mg/kg corp. *Nicotinatul α-tocoferolului* este folosit în tratamentul hiperlipidemiei în doză de 300 mg/zi pentru omul adult, o perioadă mai îndelungată. Tocoferilchinona se foloseşte în tratamentul hipertensiunii arteriale, în afecţiuni cutanate, musculare şi în psihiatrie, în doze cuprinse între 100—600 mg/zi în funcţie de graviditatea afecţiunii.

Scanned with OKEN Scanner

Tabelul 4.7

Bolile care apar în carența tocoferolilor la animale, țesuturi și organe afectate și tratament profilactic
(după ENESCU, 1990, cu modificări)

Boala	Animale	Țesuturi și organe afectate	Prevenire, tratament tocoferoli
A. **Deficiențe de reproducere**		a. *Țesut afectat*	
Degenerescență embrionară	Femele șobolan, bovine, ovine, găină, curcă	Sistem vascular embrionar	Asociații cu vit. A și Prolan E
Tip B	Bovine	Sistem vascular embrionar	Vit. A+E+Seleniu (Turlin)
Sterilitate	Șobolan, cobai, câine, ovine, bovine, hamster	Gonade masculine	Vit. A+E (Turlin)
Necroză hepatică	Șobolan, porcine, ovine	b. *Organe afectate* Ficat	80—100 mg/zi+ seleniu
Hemoliză	Șobolan, găină, om	Eritrocite	— II —
Anemie	Maimuță, ovine	Măduva osoasă	50 mg/zi
Degenerescență renală	Șobolan, maimuță, ovine	Tubii renali	50 mg/zi + Se
Steatoză	Porcine, pui de găină	Țesut adipos, ficat	10—50 mg/zi
Encefalomalacie	Păsări	Encefalul	10—40 mg/zi
B. **Miopatii nutriționale**			
Distrofie musculară	Iepuri, cobai, maimuță	Mușchii scheletci	50—600 mg/zi
Tip A	Șoareci, bovine	Mușchii scheletici	— II —
Tip B	Miel, vițel, ied	Mușchi scheletici, inima	60—150 mg/zi + + Seleniu
Tip C	Curcan, pui, rață	Cord	— II —
Tip D	Pui găină	Mușchii scheletici	10 mg/zi

Tocoferolii alături de vitaminele A, K, C se folosesc în tratamentul melanoamelor, prin blocarea activității tirozinazei și reechilibrarea potențialului redox celular. În astfel de tratamente se pot folosi și tocoferoli în amestec cu săruri de seleniu, care prin capacitatea mare pe care o are în transferul de electroni, contribuie la reglarea potențialului redox. În tratamentul antimelanom este indicat a se folosi și lactatul de zinc.

În combaterea infecundității la vaci, oi, scroafe, se fac tratamente cu amestec de vitamine E și A, folosind flacoane de 100 ml, care conțin 100 000 UI de vitamina A și 50 mg vitamina E/ml. Prevenirea fătărilor premature și moartea vițeilor se poate realiza prin injectarea vacilor gestante cu 50—60 zile înainte de fătare, cu un amestec de

Scanned with OKEN Scanner

tocoferoli și selenit de sodiu. Același amestec s-a dovedit a fi eficient în stimularea biosintezei anticorpilor la iepure. Artritele clinice la câini și pisici sunt ameliorate prin administrarea de capsule a 70 UI α-tocoferol, asociat cu 1 mg selenit de sodiu. În tabelul 4.7 se prezintă bolile care apar în carența tocoferolilor, țesuturile și organele afectate și tratamentul profilactic.

Tocoferolii măresc rezistența animalelor de fermă la infecții. Bovinele în stări de hipovitaminoză au o slabă rezistență față de infecția cu *Brucella abortus bovi* sau *Micobacterium tuberculosis bovis*.

Acetatul de α-tocoferol, pentru a putea fi utilizat în terapeutică, trebuie să se prezinte ca o soluție galbenă vâscoasă, limpede, fără gust și miros, ușor solubilă în alcool, acetonă și uleiuri vegetale. Preparatele cu α-tocoferol în soluție se brunifică la lumină, fapt pentru care se vor păstra la întuneric.

În Farmacopeea României, ediția a IX-a, se menționează metodele de identificare a α-tocoferolilor din preparatele farmaceutice. Dintre acestea cel mai rapid și mai simplu este cel care menționează că prin tratarea a 1 ml de H_2SO_4 concentrat cu 5 mg preparat farmaceutic se formează o colorație verde-galbenă, iar la adăugarea de acid azotic apare o culoare roșie-brună. Un alt procedeu constă în tratarea preparatului farmacetutic cu $FeCl_2$ în prezența dipiridamolului, cu formarea unei colorații galben-roșie.

Pentru dozarea tocoferolilor din Polivitaminizant S drajeuri, acestea se dizolvă în etanol absolut, iar extincția se citește la 285 nm. Vitaminele E se pot oxida cu $AgNO_3$ în soluție de metanol, determinându-se absorbția în lumina UV la 265, 292 și 300 nm.

Tratamentele cu tocoferoli sunt incompatibile cu substanțe oxidante și cu cele care prin hidroliză dau reacție alcalină.

Tocoferolii sunt mai bine resorbiți intramuscular dacă sunt solubilizați în prealabil cu substanțe tensioactive (polisorbat 80), care influențează permeabilitatea membranelor, favorizând resorbția lor. In industria alimentară tocoferolii sunt folosiți pentru a mări conservabilitatea unor alimente (unt, margarină, uleiuri vegetale, preparate din carne de porc etc.), datorită proprietăților antioxidante pe care la au. Aceste tratamente se realizează la scară industrială cu conținut relativ redus de tocoferol (0,01—0,03%), în asociere cu acidul citric și vitamina C, fără a se depăși dozele uzuale, spre a nu se modifica gustul produselor alimentare.

Scanned with OKEN Scanner

Capitolul 5. VITAMINE K

5.1. Scurt istoric 133
5.2. Structură, reprezentanți și activitate 134
5.2.1. Vitamine K naturale 134
5.2.2. Vitamine K de sinteză 137
5.2.3 Corelația dintre structură și activitatea vitaminică 138
5.3. Proprietăți generale 142
5.4. Metode de identificare și dozare 143
5.5. Răspândire și necesități 145
5.6. Absorbție, excreție și biosinteză 148
5.7. Rol și acțiune biologică 150
5.7.1. Rolul vitaminelor K în coagularea sângeiui 150
5.7.2. Rolul vitaminelor K în procese de oxidoreducere 153
5.8. Hipovitaminoze și hipervitaminoze K 155
5.9. Interacțiuni cu alte vitamine și cu medicamente 158
5.10. Antivitamine K 160

Vitaminele K se mai numesc și *vitamine antihemoragice* sau *vitamine pentru coagularea sângelui* (koagulation vitamin). În lipsa lor la om și la animale apar hemoragii gastrointestinale, nazale, cutanante etc.

Vitaminele K sunt sintetizate numai de plante și microorganismele din tubul digestiv și prestomacele ierbivorelor. Animalele nu le pot biosintetiza, fiind nevoite să și le procure o parte prin hrană. Pentru animale sursa principală de vitamine K o formează microorganismele din tubul digestiv. Se găsesc în cantitate mai mare în frunze de lucernă, trifoi, spanac și în făina de pește în putrefacție.

Ca acțiune biologică specifică, vitaminele K determină coagularea sângelui. În lipsa lor din organism, apar hemoragii, datorită netransformării protrombinei în trombină, prelungirii timpului de coagulare a sângelui.

Sub aspect structural, vitaminele K naturale sunt derivați naftochinonici, care au o largă răspândire în plante și microorganisme. Alături de vitaminele naturale K_1 și K_2 există numeroși compuși de sinteză (vitamerele), folosiți în terapeutică, cu acțiune similară vitaminelor K. Noțiunea de vitamină K trebuie înțeleasă ca termen generic, care reprezintă proprietatea esențială a tuturor vitaminelor K.

Scanned with OKEN Scanner

5.1. SCURT ISTORIC

În perioada 1929—1930, *H. Dam* a constatat că la puii de găină hrăniți cu o dietă sintetică apar hemoragii în tubul digestiv și în mușchi. Prin adăugarea în dietă a vitaminelor A, D și C nu s-a remarcat nici o ameliorare, în timp ce adăugarea în dietă a plantelor verzi și a semințelor de cereale germinate, acestea au avut efecte curative. Cercetările efectuate de *H. Dam* au condus întâmplător la descoperirea vitaminei K. El dorea să cunoască metabolizarea colesterolului la puii de găină hrăniți cu regim sintetic, la care însă a apărut „boala hemoragipară" sau „sindromul lui Dam", caracterizat prin apariția de hemoragii în diferite țesuturi și organe, care nu dispăreau la adăugarea în dietă a vitaminelor A, D și C, ci numai la adăugarea în hrană a plantelor verzi. H. Dam a demonstrat ulterior, în 1934, că hemoragia este cauzată la puii de găină de absența din alimente a unui factor, diferit ca structură și proprietăți de vitaminele A, D, C, E, pe care îl denumește *factor de coagulare* sau vitamina K (koagulation vitamin).

În 1931, *G. McFarlane* confirmă rezultatele cercetărilor efectuate de *H. Dam* în pericada 1929—1930 și lărgește sfera de acțiune a vitaminei K, arătând că la toate păsările apar hemoragii dacă sunt hrănite cu diete sărace în grăsimi. Totodată, *G. McFarlane* arată că hemoragiile care apar la păsări pot fi tratate și cu carne de pește adăugată în dieta păsărilor. *G. McFarlane* în colaborare cu *F. Schönheyder* au stabilit în 1933 relația care există între vitamina K și coagularea sângelui, arătând că sângele care provenea de la păsările cu hemoragii, avea un conținut redus de protrombină și un timp de coagulare a sângelui prelungit, față de lotul martor.

În 1937, *T. Quick* remarcă o scădere progresivă a conținutului protrombinei din sângele puilor de găină care erau furajați cu hrană săracă în vitamina K. Scăderea protrombinei s-a remarcat la puii până la vârsta de un an, când încep să apară hemoragiile în mod masiv. Puii erau vindecați prin administrarea de furaje bogate în vitamina K. Inițial s-a considerat că apariția hemoragiilor în hipovitaminoză K era specifică puilor și păsărilor. Ulterior, hemoragiile au fost determinate experimental și la om și animale, pe baza instalării hipovitaminozei K. Mamiferele care experimental erau lipsite de bila intestinală, aveau conținutul redus de protrombină și vitamina K în sânge, prezentând tendință hemoragică. Cercetările efectuate pe șobolani, câini și oameni cu fistulă hepatică experimentală, au confirmat că în lipsa bilei din intestin apar hemoragii asociate cu hipoprotrombinemie, datorită deficienței în vitamina K.

În 1939, *H. Dam, A. Grieger* și *P. Karrer* reușesc să izoleze vitamina K sub forma unui ulei de culoare galbenă, iar *E. Binkley* a obținut-o în stare cristalină având punctul de topire la —20°C. Tot în perioada anilor 1935—1939 s-a arătat că lucerna proaspătă este o sursă naturală cu conținut ridicat în vitamina K și în alți compuși cu activitate biologică similară vitaminei K (ENESCU, 1990).

În 1939, *P. Karrer* și *A. E. Doisy* reușesc să obțină 0,5 g de vitamina K_1 în stare cristalină din 30 kg pulbere uscată de făină de lucernă, iar *A. E. Doisy* obține din pulbere uscată de pești intrată în putrefacție, vitamina K_2. Tot în 1939, se raportează izolarea vitaminei

Scanned with OKEN Scanner

K_1 din făină de lucernă și a vitaminei K_2 din carne de pește putredă, de către colectivele conduse de *W. D. McCorquadale* și respectiv *R. W. McKee*. În același an, *H. Y. Almquist* și *A. Klose* (1939) raportează identificarea și izolarea ftiocolului (2-metil-3-hidroxi-1, 4-naftochinonă) din bacilul tuberculozei, compus cu acțiune coagulantă.

Apariția mai frecventă a hipovitaminozei K la păsări se explică prin aceea că au un intestin mai scurt, cu floră simbiotică mai redusă, care are un rol însemnat în aprovizionarea organismelor animale cu vitamina K.

Pe lângă vitaminele K naturale (K_1, K_2, ftiocol) liposolubile, cu structură cunoscută, în practica medico-farmaceutică se folosesc numeroase vitamine K de sinteză, majoritatea hidrosolubile, care nu au corespondent în natură.

5.2. STRUCTURĂ, REPREZENTANȚI ȘI ACTIVITATE

5.2.1. VITAMINE K NATURALE

Din punct de vedere chimic, vitaminele K naturale sunt formate dintr-un nucleu naftochinonic care are substituit la C-3 o grupare metilică și la C-2 o catenă laterală caracteristică fiecărei vitamine formată din 10—50 atomi de carbon. Structura nucleului 2-metil-1,4-naftochinonic se prezintă în figura 5.1.

Astfel, vitamina K_1 are catena laterală formată din fitil ($C_{20}H_{39}$), derivat din fitol, fapt pentru care se mai numește și *filochinonă*, iar vitamina K_2 conține radicalul difarnesil ($C_{30}H_{49}$), de unde îi derivă numele de *farnochinonă*.

Structura moleculară a vitaminelor K_1 și K_2 se prezintă în figura 5.2.

Vitamina K_1 (2-metil-3-fitil-1,4-naftochinona), numită și filochinonă, are formula elementară $C_{31}H_{46}O_2$ și masa moleculară 450. Se prezintă sub formă de ulei galben, insolubil în apă, solubil în solvenți organici. Se distruge ușor sub acțiunea luminii, a oxigenului (oxidanților) și în mediu bazic. Prezintă o fluorescență albă caracteristică la lampa cu argon. Prin oxidare dă un compus galben. Are un potențial de oxidoreducere de E = —0,05 volți, având un rol important în reacțiile de oxidoreducere din celule. Se obține în stare cristalină la —20°C și se fierbe între 115 și 145°C. Catena laterală este formată din

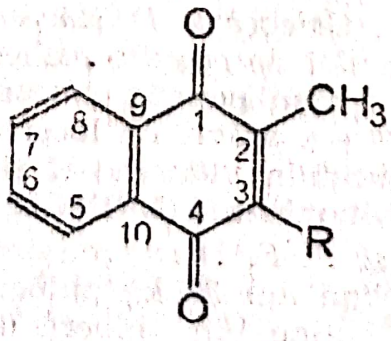
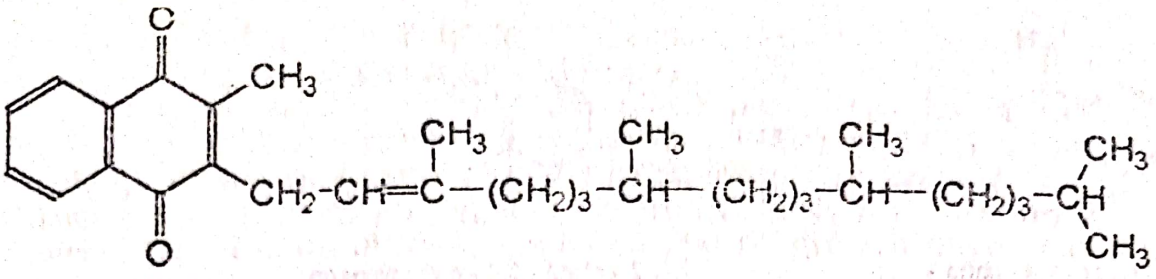
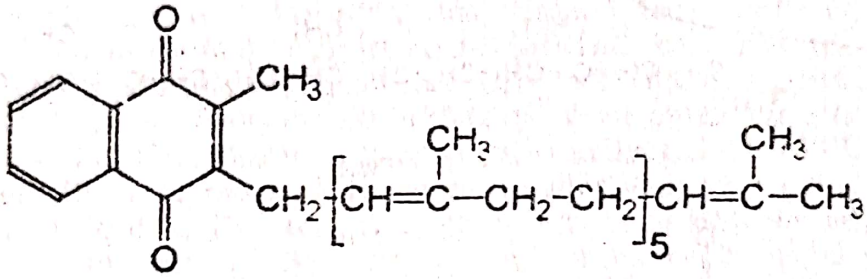


Fig. 5.1. Structura nucleului 2-metil-1,4-naftochinonic

Scanned with OKEN Scanner



vitamina K_1



vitamina K_2

Fig. 5.2. Structura moleculară a vitaminelor K_1 și K_2

radicalul fitil, care conține o singură dublă legătură, în poziție trans, între atomii C-2'—C-3'. Spectrul de absorbție prezintă o structură chinoidă, cu maxime de absorbție la 243, 248, 261, 270, 320 nm. Se obține sintetic din 2-metil-1,4-naftohidrochinonă și fitol, în prezența unui catalizator ($AlCl_3$, $ZnCl_2$, $KHSO_4$) sau din 2-metil-1,4-naftohidrochinonă și fitol în prezența acidului oxalic sau a acidului tricloracetic (figura 5.3) cu un randament de 65%. *J. Isler* a obținut vitamina K_1 racemică din menadiol și izofitol racemic. Vitamina K_1 notată și $K_1(20)$ întrucât are catena laterală formată din C_{20}, are mai mulți derivați care au catena laterală formată din $5 \times n$ unități izopentenice, cu valoarea lui n între 1 și 6. Catena laterală a acestor derivați ai vitaminei K_1 au o dublă legătură la începutul catenei laterale, între atomii C-2'—C-3'.

Vitamina K_1 a fost izolată din cloroplastele frunzelor verzi din lucernă, spanac, urzici, roșii, iar ulterior și din ficatul animalelor.

Vitamina K_2 (2-metil-3-difarnesil-1,4-naftochinonă) se mai numește și farnochinonă, întrucât are catena laterală formată din radicalul difarnesil. Este o substanță solidă, cristalină, de culoare galben-deschis cu maxime de absorbție la 243, 249, 260, 270 și 320 nm. Cristalele obținute din eter de petrol sau etanol au p.t. între 53 și 55°C. Este un derivat naftochinonic cu rol important în reacțiile de oxidoreducere, dar optic inactiv. Este sensibilă la acțiunea luminii și a bazelor alcaline.

Vitaminele K_1 și K_2 dau prin acetilare diacetați la nivelul atomilor de oxigen chinonici.

Vitamina K_2 (7n) sau $K_2(35)$ nu se găsește în plante ci numai în materiile animale (pește) în putrefacție. Ea se obține prin intermediul bacteriilor din tubul digestiv, care sunt capabile să o biosintetizeze,

Scanned with OKEN Scanner

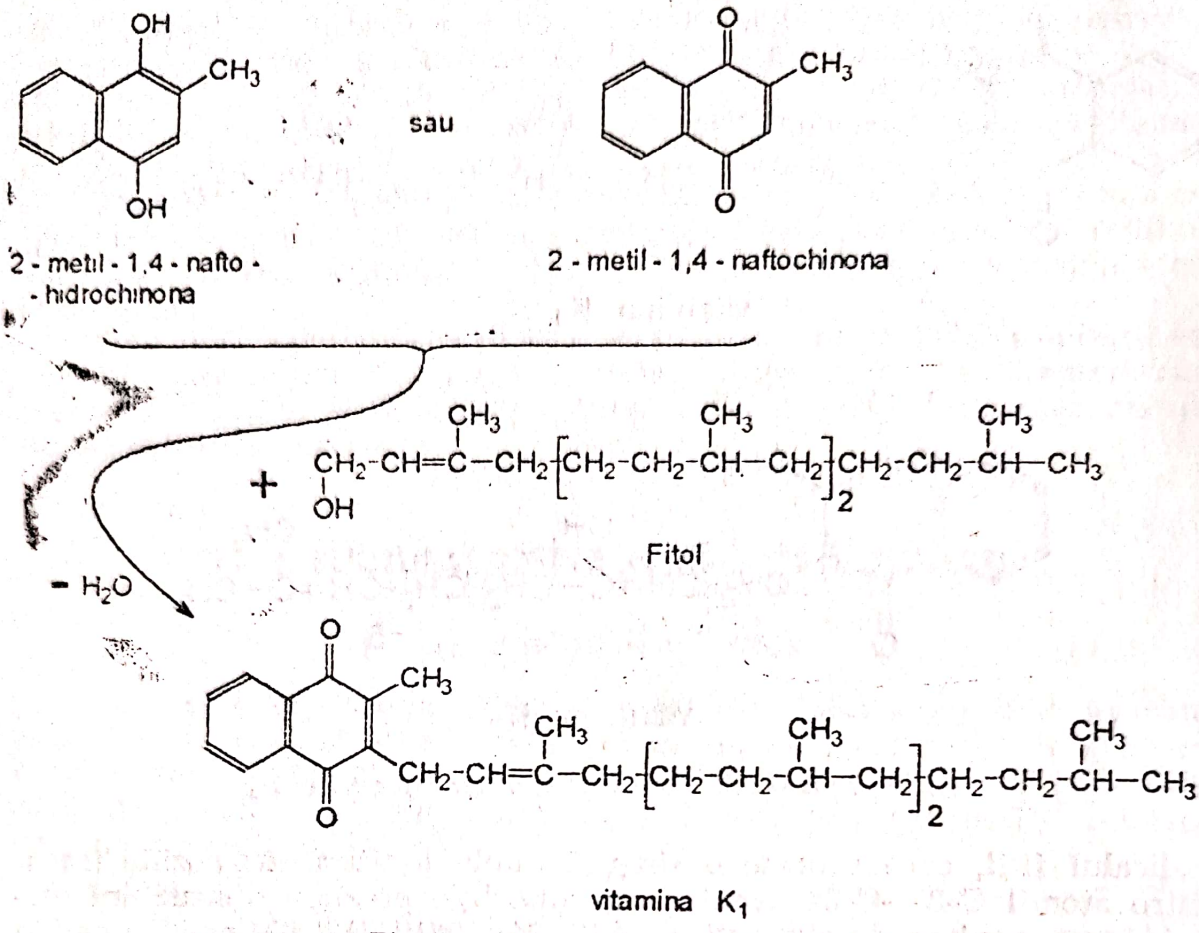


Fig. 5.3. Sinteza vitaminei K_1

contribuind și la acoperirea nevoilor oamenilor și animalelor în vitamine K.

Există mai mulți compuși naturali care intră în familia vitaminelor K_2 numite și *menachinone*. Acești compuși au catena laterală (R) formată dintr-un număr diferit de unități izoprenice care variază între 4 și 10, fapt pentru care mai poartă și denumirea generică de 3-multiprenoil-2-metil-1,4-naftochinone. Lungimea lanțului se notează fie prin numărul resturilor izoprenice, sau prin numărul atomilor de carbon din catenă, sub formă de coeficient și respectiv indice în paranteză. Dintre acești compuși fac parte menachinone (MKn), menachinone hidrogenate (MKn-H_2) și menachinone dimetilate (DMKn).

Vitamina K_2 (7n) sau K_2(35) are punctul de topire la 54°C, iar catena laterală este radicalul all-transfarnesil-geranil-geranil. Se găsește în intestinul gros al omului și animalelor, fiind cea mai răspândită din această familie de vitamine.

Vitamina K_2 (6n) sau K_2(30) are catena laterală formată din radicalul all-trans-difarnezil, se găsește în numeroase surse vegetale. Se topește la 49—50°C. În mediu alcalin și expusă la lumină se descompune.

Vitamina K_2 (9n) sau K_2(45) s-a extras din bacilul tuberculozei și din diferite produse naturale. În organismele animalelor cărora li s-a dat în hrană 2-metil-1,4-naftochinonă s-a găsit o vitamină K_2 (4n) sau K_2 (20) izolată din ficat, mușchi, rinichi, inimă, iar în micobacterii

Scanned with OKEN Scanner

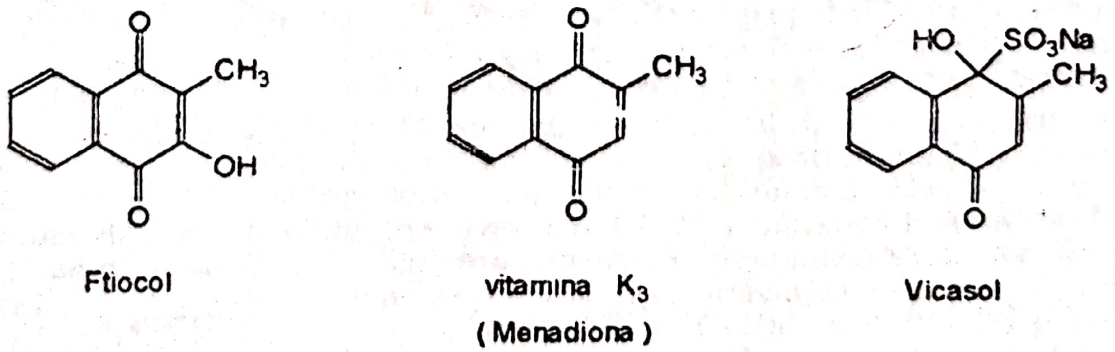
o vitamină K_2 (10n) sau K_2(50). Importantă este și vitamina K_2 (8n) sau K_2(40) larg răspândită în regnul vegetal.

Ftiocol extras din bacilul tuberculozei are catena laterală substituită printr-o grupare hidroxilică la C-3 (figura 5.4 A). Ftiocolul ($C_{11}H_8O_3$), numit și 2-metil-3-oxi-1,4-naftochinonă, se prezintă sub formă de prisme galbene cu punct de topire la 173°C. Este solubil atât în solvenți organici, cât și în apă. Este de 500 de ori mai puțin activ decât menadiona.

5.2.2. VITAMINE K DE SINTEZĂ

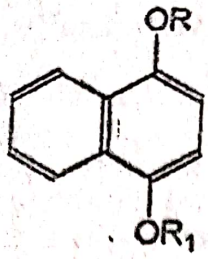
Dintre vitaminele K obținute prin sinteză face parte vitamina K_3 (2-metil-1,4-naftochinona), numită și menadionă, care are cea mai simplă structură moleculară (figura 5.4 B). Este iritantă pentru piele și căile respiratorii, iar soluția alcoolică este vezicantă. Are punct de topire la 105—107°C. Soluțiile uleioase se sterilizează la 150°C, timp de o oră. Menadiona formează complecși în soluții apoase cu cafeina, nicotinamida, acidul sialic etc., care sunt mai rezistenți la acțiunea luminii decât vitamina K_3. Se extrage din gudroane de cărbune, iar industrial se obține prin sinteză, din naftalină prin oxidare cu acid cromic sau cu H_2O_2 în curent de aer. Menadiona este o substanță solidă, cristalină, de culoare galbenă, fără gust specific, solubilă în alcool, benzen, uleiuri vegetale și insolubilă în apă, cloroform, tetraclorură de carbon. Sub influența luminii se colorează și se descompune. În terapie se folosesc produși de adiție cu bisulfit care sunt hidrosolubili, dintre care cel mai important este vicasolul (fig. 5.4). Acest compus se prezintă sub formă de pulbere albă, cristalină, solubilă 1:2 în apă și insolubilă în solvenți organici. Este higroscopică și sub acțiunea luminii se colorează în violet. Soluția apoasă nu poate fi sterilizată prin căldură datorită faptului că hidrolizează. Menadiona are a putere biologică mai puternică decât vitaminele K naturale, fapt pentru care este cea mai utilizată în tratamentele clinice. Menadiona dată în cantități mari devine toxică.

Vitaminele K_4 au la bază ciclul 2-metil-1,4-naftohidrochinonic. Cel mai important reprezetant din această grupă este menadiolul (2-metil-1,4-naftohidrochinona), forma redusă a menadionei. Prin esterificarea grupărilor hidroxilice se obțin numeroși compuși de interes terapeutic (BEDELEANU, 1985). Vitamina K_4 s-a obținut prin reducerea 2-metil-1,4-naftochinonei cu ajutorul zincului și a acidului acetic,



Ftiocol — vitamina K_3 (Menadiona) — Vicasol

Fig. 5.4. Structura moleculară a ftiocolului, a menadionei și a vicasolului



$R = R_1 = H$: menadiol
$R = R_1 = (-COCH_3)$: diacetilmenadiol
$R = R_1 = (-CO-CH_2-CH_2-CH_3)$: butirat (karan)
$R = R_1 = (-CO-CH_2-CH_2-COOH)$: succinat
$R = R_1 = -SO_3Na$: sulfonat
$R = R_1 = -PO(ONa)_2$: fosfit

vitamine K_4
(Menadioli)

Fig. 5.5. Vitamine K_4

în mediu de anhidridă acetică, se oxidează ușor în aer și nu are utilizare terapeutică. Este important însă pentru sinteza vitaminei K_1 (fig. 5.5).

Dacă din molecula menadiolului (vitamina K_4) se substituie o grupare hidroxilică (OH) cu o grupare aminică (NH_2) se obțin *vitaminele* K_5 și K_7, care sunt izomeri, iar prin substituirea ambelor grupări hidroxilice se obține *vitamina* K_6 (fig. 5.6).

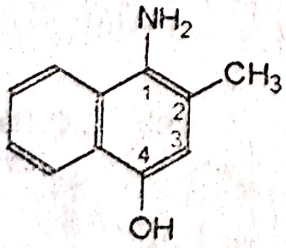
Vitaminele K_4, K_5, K_6 și K_7 sub formă de clorhidrați sunt hidrosolubile și se obțin prin sinteză, utilizându-se ca substanță de bază 2-metil-naftochinona.

Aceste vitamine reacționează cu HCl la nivelul grupării aminice și formează clorhidrați ușor solubili în apă, folosiți în terapeutică.

Stabilitatea vitaminelor K și a derivaților acestora depind foarte mult de mediul în care se păstrează, având un rol însemnat acțiunea luminii ultraviolete, a oxigenului, pH-ului, natura solvenților.

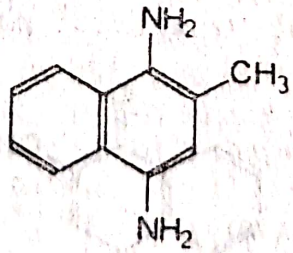
5.2.3. CORELAȚIA DINTRE STRUCTURĂ ȘI ACTIVITATEA VITAMINICĂ

Pe baza a numeroase cercetări s-a stabilit că acțiunea specifică a vitaminelor K este determinată de ciclul naftochinonic, fiind absolut indispensabile din acest ciclu, inelul benzenic nesubstituit (ciclu A) și gruparea metilică de la C-2 a ciclului B (fig. 5.7). În această figură se prezintă cicluri condensate cu proprietăți coagulante asupra sângelui.



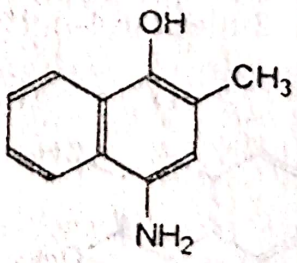
1 - amino - 4 - hidroxi - 2 - metilnaftalina

(vitamina K_5)



1,4 - diamino - 2 - metilnaftalina

(vitamina K_6)



4 - amino - 1 - hidroxi - 2 - metilnaftalina

(vitamina K_7)

Fig. 5.6. Structura moleculară a vitaminelor K_5, K_6 și K_7

Scanned with OKEN Scanner

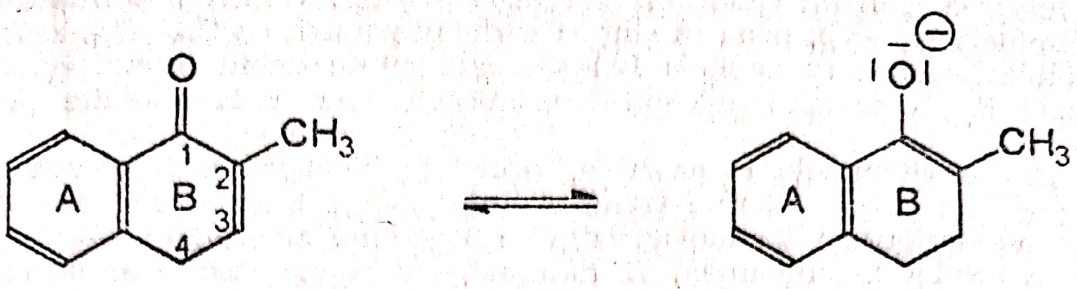


Fig. 5.7. Cicluri condensate cu proprietăți coagulante

3 - metil - 4 - hidroxicromona (I)

3 - metil - cromona (II)

Fig. 5.8. Compuși heterociclici cu acțiune vitamincă K

Dintre compușii heterociclici cu acțiune biologică similară vitaminei K_1, fără catenă laterală, menționăm 3-metil-4-oxocromona (I) și 3-metil-cromona (II) (fig. 5.8).

O substanță poate manifesta proprietăți coagulante asupra sângelui dacă prezintă două nuclee condensate, dintre care un ciclu benzenic (ciclul A) și este nesubstituit, iar al doilea ciclu (ciclul B) poate să fie aromatic sau heterociclic, cu o grupare metil substituită la atomii de carbon C-2 sau C-3. Analizând cu mai mare atenție structura compușilor vitaminici K, cu acțiune coagulantă asupra sângelui, se poate constata că partea care determină specificitatea de acțiune a acestor compuși este sistemul:

$$-\underset{\underset{O}{\|}}{C}-\underset{\underset{R}{|}}{C} \rightleftharpoons -\underset{\underset{O}{|}}{C}=\underset{\underset{R}{|}}{C}-$$

Dacă în acest sistem, R este substituit cu gruparea metilică, se obțin vitamine K și derivați ai acestora, iar dacă R este substituit cu radicali cu catenă carbonică mai mare ($R > CH_3$), se obțin antivitamine K.

Prezența grupării metil substituită în ciclul B condensat cu nucleul benzenic (ciclul A) este absolut necesară pentru menținerea proprietății biologice a compușilor cu acțiune coagulantă. Simpla sa prezență, conferă nucleului de bază o intensă activitate vitaminică. Eliminarea sa determină pierderea activității vitaminice a acestor compuși, iar înlocuirea sa cu resturi alifatice, aromatice sau heterociclice poate conduce la formarea de antivitamine K. Mai puțin interes pentru menținerea activității specifice a vitaminelor K o prezintă substituen-

ții fixați la C-3 din ciclul B, care sunt foarte variați, de la hidrogen (vitaminele K_3—K_7), până la lanțuri carbonice lungi, cu C_{10}—C_{50}, având o dublă legătură (vitaminele K_1) sau mai multe duble legături (vitaminele K_2), care fără îndoială imprimă vitaminelor K anumite proprietăți.

Dintre vitaminele K naturale, activitate biologică mai intensă au compușii cu catene laterale formate din C_{20}—C_{30}. Catena laterală poliizoprenică asigură vitaminelor naturale o acțiune moleculară antitoxică asupra celulelor. Vitaminele K naturale, cu catene carbonice laterale lungi, sunt liposolubile și au o durată de acțiune mai îndelungată, chiar dacă este moderată ca intensitate. Vitaminele de sinteză, care au la C-3 hidrogen, sunt în majoritatea cazurilor hidrosolubile (cu puține excepții). Ele au o acțiune vitaminică mai intensă și rapidă, dar de o durată mai scurtă. Este posibil ca unele vitamine sau compuși vitaminici cu grupări aminice, prin metabolizare să refacă nucleul 1,4-naftochinonic, iar de acesta să se lege ulterior o catenă laterală, formându-se astfel o nouă vitamină K.

Menadiona (vitamina K_3), deși este complet lipsită de catena laterală, prezintă proprietăți biologice mai puternice decât ale vitaminelor K_1 și K_2.

Menadiolul (vitamina K_4), obținut prin reducerea menadionei, este de asemenea un compus vitaminic activ din punct de vedere biologic. Deoarece acesta se oxidează ușor la aer, este administrat în terapeutică sub formă de 2-metil-1,4-diacetoxinaftalen. Dacă grupările -OH din pozițiile 1 și 4 ale menadiolului se înlocuiesc cu una sau două grupări aminice și apoi se tratează cu acid clorhidric se obțin vitaminele K_5, K_6 și K_7 sub formă de clorhidrați care sunt stabili și hidrosolubili, reprezentând forma farmaceutică cea mai potrivită care se aplică în tratamente profilactice și curative (fig. 5.9).

Activitatea vitaminică antihemoragică și coagulantă a vitaminelor K și a derivaților acestora s-a dovedit că este determinată de o anumită structură a nucleului 2-metil-1,4-naftochinonic. Compușii hidrochinonici, eterii, esterii sau aminele lor, care în organism se pot transforma în compuși chinonici, au și ele activitate vitaminică.

Faptul că 2-metil-1,4-naftochinona este mai activă decât vitaminele naturale a sugerat ipoteza degradării catenelor laterale ale acestora în organism, cu formarea nucleului 2-metil-1,4-naftochinonic. Există numeroși compuși naturali și de sinteză care conțin în molecula lor nucleul 2-metil-1,4-naftochinonic sau 2-metil-1,4-hidrochinonic,

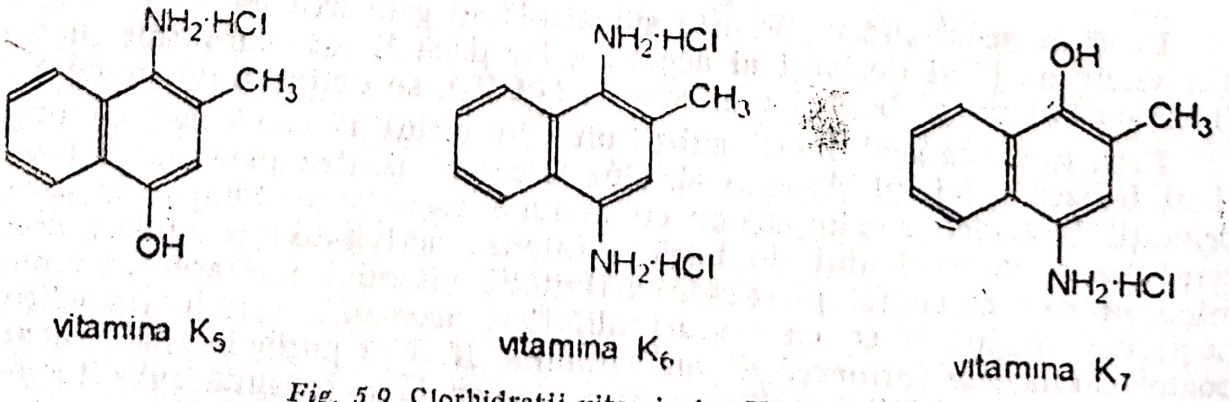


Fig. 5.9. Clorhidrații vitaminelor K_5, K_6 și K_7

Scanned with OKEN Scanner

care prezintă proprietăți coagulante, dintre care o parte se prezintă în tabelul 5.1, menționându-se și intensitatea activității vitaminice. Cu cât valoarea dozei active se exprimă prin cifre mai mici, cu atât compușii vitaminici au valoare vitaminică mai mare și invers. Deci între activitatea vitaminică a compușilor și valoarea dozei active la microorganisme, exprimată în cifre (tabelul 5.1), există o relație invers proporțională. Specificitatea acțiunii vitaminice nu depinde de liposolubilitate. O bună parte din compușii prezentați în tabelul 5.1. sunt hidrosolubili, fiind un element ajutător în administrarea per os a acestor compuși.

Tabelul 5.1

Compuși cu acțiune vitaminică K
(după CHIOSA și colab., 1955, cu modificări)

Compus	Doza activă în microorganisme
A. *Gruparea 2-metil-3-alchil și 3-β-alchenil-1,4-naftochinona*	
2-metil-3-fitil-1,4-naftochinonă (K_1)	1
2-metil-3-difarnesil-1,4-naftochinonă (K_2)	1,6
2-metil-3-farnesil-1,4-naftochinonă	5
2-metil-3-(β,γ-dihidrofitil)-1,4-naftochinonă	8
2-metil-3-geranil-1,4-naftochinonă	25
2-metil-3-cinamil-1,4-naftochinonă	25
2-metil-3-(β,γ,γ-trimetilalil)-1,4-naftochinonă	50
2,3-dimetil-1,4-naftochinonă	50
2-metil-3-benzil-1,4-naftochinonă	200
2-metil-3-hidrocinamil-1,4-naftochinonă	300
B. *Gruparea 2-alchil și 2-β-alchenil-1,4-naftochinonă*	
2-metil-1,4-naftochinonă	0,3
2-fitil-1,4-naftochinona	50
2-farnesil-1,4-naftochinonă	500
2-(β,γ-dihidrofitil)-1,4-naftochinonă	600
2-(n-hexadecil)-1,4-naftochinonă	650
2-alil-1,4-naftochinonă	800
2-geranil-1,4-naftochinonă	1 000
C. *Naftochinone puternic alchilate*	
2-etil-3-fitil-1,4-naftochinonă	1 000
2,3-dialil-1,4-naftochinonă	1 000
2,5-dimetil-1,4-naftochinonă	500
2,7-dimetil-1,4-naftochinona	1 000
1,2,4-trihidroxiantrachinonă	100
D. *Carbetoxi- și hidroxinaftochinone*	
2-metil-3-carbetoxi-1,4-naftochinonă	25
2-metil-5-hidroxi-1,4-naftochinonă	400
3-metil-3-hidroxi-1,4-naftochinonă (ftiocol)	500
E. *Oxizi ai naftochinonei*	
Vitamina K_1 oxid	1,5
2-metil-1,4-naftochinonoxid	5
2,3-dimetil-1,5-naftochinonoxid	24
2-metil-3-cianamil-1,4-naftochinonoxid	150
2-fitil-1,4-naftochinonoxid	200
2-farnesil-1,5-naftochinonoxid	1 000
2,7-dimetil-1,4-naftochinonoxid, inactic la	1 000

Scanned with OKEN Scanner

Tabelul 5.1 (continuare)

Compus	Doza activă în microorganisme
F. *Chinone diferite*	
2-metil-2-fitil-2'3-dihidro-naftochinona	50
2,3,5-trimetil-6-fitil-1,4-benzochinona, inactivă la	1 000
2,3,5-trimetil-1,5-benzochinona, inactivă la	1 000
α-tocoferolchinonă, inactivă la	1 000
naftotocoferol	500
2,5-dimetil-benzochinonă	3 000
G. *Esteri și eteri ai hidrochinonei*	
sodiu-2-metil-1,4-naftohidrochinondifosfat	0,5
sodiu-2-metil-1,4-naftohidrochinondisulfat	2
vitamina K_1 hidrochinondisulfat	50
sodiu-2,3-dimetil-1,4-naftohidrochinondisulfat	500
potasiu-vitamin K_1-hidrochinondisulfat, inactiv la	500
diacetat de 2-metil-1,4-naftohidrochinonă	1
monoetil eter de 2-metil-1,4-naftohidrochinonă	1
dibenzoat de 2-metil-1,4-naftohidrochinonă	1
dimetil eter de 2-metil-1,4-naftohidrochinonă	5
dibenzil eter	7
vitamina K_1 hidrochinondiacetat	2
vitamina K_2 hidrochinondiacetat	3,2
H. *Compuși aminați*	
4-amino-2-metil-1'-naftohidroclorid	1
4-amino-3-metil-1-naftohidroclorid	1
2-metil-1-naftifamină	5
I. *Hidride ale vitaminei K_1 și ale metilnaftochinonei*	
5,8-dehidrovitamina K_1	4
β,γ,5,6,7,8-hexahidrovitamina K_1	1 000
2-metil-5,8-dihidro-1,4-naftochinona	6
2-metil-5,8,9,10-tetrahidro-naftochinona	8
2-metil-5,6,7,8-tetrahidro-1,4-naftochinona	500
J. *Metilnaftoli-, metiltetralone și compuși alăturați*	
2-metil-1,4-naftohidrochinonă	0,5
2-metil-naftol	1
3-metil-1-naftol	0,6
4-metil-1-naftol, inactiv la	1 000
1-metil-2-naftol, inactiv la	1 000
1-naftol	100
2-metil-1-tetralon	0,6
3-metil-1-tetralon	1
β-metilnaftalen	1 000

5.3. PROPRIETĂȚI GENERALE

Vitaminele K sunt substanțe care în stare pură se găsesc sub formă de uleiuri (K_1) sau în stare cristalină (K_2-K_7), având în general culoarea galbenă. Sunt foarte sensibili la acțiunea luminii și a oxigenului, fapt pentru care se recomandă păstrarea acestora la întuneric. Sub acțiunea luminii ultraviolete și a oxidanților se degradează ușor, dând compuși

Scanned with OKEN Scanner

de culoare închisă. Prezintă spectre de absorbție caracteristice, majoritatea având benzi de absorbție de lungimi de undă cuprinse între 243—328 nm.

Vitaminele K naturale (K_1 și K_2) sunt substanțe liposolubile, insolubile în apă, dar solubile în solvenți organici și în grăsimi. Au catena laterală formată din C_{10}—C_{50}, care le imprimă proprietăți antitoxice. Fitocolul este solubil atât în solvenți organici cât și în apă. Vitamina K_1 este optic activă (—0,71°), iar vitamina K_2 este optic inactivă.

În stare solidă vitaminele K prezintă o fluorescență roșie caracteristică, care sub influența razelor UV trece ireversibil în verde intens, iar ulterior se degradează. În soluții acide vitaminele K sunt termostabile, însă în mediu alcalin, la cald, se distrug.

Vitaminele de sinteză (K_3—K_7) sunt substanțe solide, solubile în apă (excepție vitamina K_3), fără catenă laterală, care administrate în doze mari devin toxice. Grupările hidroxilice din nucleul 2-metil-1,4-naftohidrochinonic pot fi esterificate, eterificate sau substituite cu grupări aminice, formând compuși mai stabili, cu activitate vitaminică uneori mărită, frecvent utilizați în practica farmaceutică. Compușii aminici se prepară sub formă de clorhidrați iar majoritatea esterilor se obțin cu acizii acetic, sulfuric și fosforic. Eterii au o activitate biologică mai slabă decât vitaminele în stare pură. Vitaminele K_2 nu au activitate optică, iar cele lichide se obțin în stare cristalină la temperaturi sub —20°C în atmosferă de azot.

Vitaminele K au un caracter antioxidant pronunțat, iar prin trecerea reversibilă a grupărilor cetonice în grupări hidroxilice contribuie la reglarea potențialului oxido-reducător din celule și la transportul hidrogenului pe cale neenzimatică. Ele sunt instabile în mediu alcalin și au potențiale redox în valori mici, fapt ce le imprimă o reactivitate chimică sporită.

5.4. METODE DE IDENTIFICARE ȘI DOZARE

Metode fizice. Dintre metodele fizice cele mai frecvent utilizate pentru identificarea și dozarea vitaminelor K, sunt metodele spectrofotometrice și potențiometrice. Vitaminele K prezintă în lumină ultravioletă și infraroșie spectre de absorbție care pot servi la identificarea și dozarea lor. Din nefericire nu toate spectrele de absorbție în UV și IR sunt specifice și caracteristice pentru toate vitaminele K și compușii acestora, fapt pentru care metodele spectrofotometrice trebuie să fie însoțite de metode chimice și(sau) biologice, pentru o identificare și dozare cât mai precisă.

Vitaminele K în soluție hidroalcoolică de $CaCl_2$, dau o undă catodică la potențial pe jumătate, care poate fi determinată potențiomertic.

Metode chimice. Vitamina K_1 se dozează colorimetric pe baza reacției de culoare pe care o dă cu 2,4-dinitrofenilhidrazina, formându-se o dinitrofenilhidrazină de culoare verde.

Vitaminele K prin reducere catalitică la hidrochinonele corespunzătoare, în prezența unor catalizatori de oxidoreducere 6(2,6-diclorfeno-

Scanned with OKEN Scanner

lindofenolul, $TiCl_3$ etc.), formează compuși colorați care pot fi determinați colorimetric sau spectrofotometric.

Transformarea formelor chinonice ale vitaminelor K în compuși hidrochinonici se realizează prin hidrogenare catalitică cu clorură de titan în mediu de carbonat de sodiu. Reacția trebuie să se realizeze în prezența 2,6-diclorindofenolului, care reacționează cu hidrochinonele și formează compuși colorați ce se pot fotoclorimetra. Nici această metodă nu este specifică vitaminelor K întrucât reacția este pozitivă și cu alți compuși chinonici.

Vitaminele K în soluție alcoolică reacționează cu etilcianacetat, în mediu de hidroxid de amoniu, formând o culoare galbenă, care se poate fotocolorimetra.

Vitaminele K naturale dau cu etilații sau metilații de sodiu o coloratie purpurie-albastră, care virează ulterior spre roșu, apoi se brunifică. În decursul acestei reacții, vitaminele K se transformă în 2-metil-3-hidroxi-1,4-naftochinonă. Dacă în mediul de reacție se adaugă 2,4-dinitrofenilhidrazina și se folosește numai metilat de sodiu, se obține o coloratie verde stabilă.

Vitaminele K pot fi separate prin metode cromatografice, folosind ca adsorbant hârtie siliconică.

Vitamina K_2 reacționează cu clorhidratul de cisteină sau cu dimetilanilina, formând produșii colorați, care pot fi dozați colorimetric.

Pentru identificarea menadionei se dizolvă 1 mg de substanță într-un ml de etanol și se adaugă 1 ml HCl. Vasul se încălzește pe baia de apă, iar la fierbere apare o coloratie roșie-brunie.

O altă metodă constă în tratarea unui mg de substanță, dizolvată în 1 ml soluție alcoolică, la care se adaugă 2 ml soluție NaOH 10%. În urma reacției apare o culoare verde stabilă.

În principiu, diferitele metode chimice se bazează pe coloratia purpurie-albastră pe care o dau vitaminele K cu alcoolatul de sodiu, reducerea sărurilor de titan, coloratie galbenă cu acetatul etilocianic și pe variațiile de culoare care apar în funcție de potențialul redox.

Metode biologice. Aceste metode se bazează în principal pe rolul ce-l au vitaminele K în procesul de coagulare a sângelui. Ele constau în determinarea timpului de coagulare spontană a sângelui și determinarea timpului protrombinic de coagulare. Aceste metode sunt cele mai specifice și mai des utilizate. Se folosesc atât în tratamente profilactice, cât și curative. În metodele curative se determină timpul de protrombină înainte și după administrarea unei doze normale de vitamină K la animalul carențat. Timpul necesar acestei metode este de 2—3 zile.

Pentru determinatea timpului de protrombină se iau 0,1 ml plasmă oxalată care se tratează cu 0,1 ml soluție de trombokinază și se încălzește la 37,5°C. Se adaugă apoi 0,1 ml soluție de $CaCl_2$ 0,02 M și se măsoară timpul de coagulare a amestecului. Media timpului optim la omul sănătos este de 14 secunde, care se apreciază cu 100%. Timpul de protrombină se mai numește timpul Quick. Dacă acest timp este sub 70% înseamnă că există o suferință a ficatului în folosirea vitaminei K. În asemenea cazuri se administrează animalului o doză de 20 mg vitamină K, iar după 24 de ore se determină din nou timpul Quick. Dacă acesta arată din nou un conținut redus de protrombină înseamnă

Scanned with OKEN Scanner

că animalul are leziuni celulare. Dacă timpul Quick tinde spre normal înseamnă că s-a produs icter mecanic (ENESCU, 1990). Metoda preventivă constă în determinarea dozei minime de vitamină K, necesară pentru prevenirea simptomelor avitaminozei K.

Timpul de tratament necesită 12—15 zile. Cercetările cu ajutorul izotopilor radioactivi au demonstrat că vitaminele K se depozitează în ficat, unde se metabolieză în menadoină, care la rândul său o parte va servi la biosinteza vitaminei K_2 (2n) sau $K_2(20)$, iar o parte va fi transportată în alte țesuturi. Sistemul enzimatic din mitocondrii catalizează condensarea menadionei cu geranil-geranil-pirofosfat, formându-se astfel vitamina $K_2(20)$. Cercetări efectuate „in vitro" cu omogenate de găină sau șobolan confirmă că vitamina K_2 (20) provine din menadiona marcată. În mod similar se sintetizează și vitamina $K_1(45)$ în ficatul de șobolan.

La puii de găină carențați în vitamina K, timpul de coagulare este de 60 minute, față de valorile normale de 5—10 minute. Timpul de protrombină este mai specific decât timpul de coagulare, dar este și el dependent de nivelul calcemiei. De aceea se folosește plasmă oxalacentă pentru îndepărtarea ionilor de Ca^{2+}. Puii de găină supuși unui regim fără vitamine K prezintă după 12—15 zile simptome caracteristice de avitaminoză. Apar hemoragii masive și crește timpul de coagulare a sângelui de la 4—6 minute cât este normal la păsări, la câteva ore.

Stările de hipovitaminoză K la puii de găină se pot obține și prin administrare de cloroform în doze toxice, sau de paratoluen-diamină.

Unitatea Dam reprezintă cantitatea de vitamină K/kg greutate corp, care normalizează în trei zile timpul de coagulare a puiului de găină cu carență de vitamina K. O unitate Dam este egală cu 0,083 μg vitamina K_1 sau cu 0,14 μg vitamina K_2, ori cu 0,004 μg vitamina K_3. Prescurtat această relație se scrie:

$$1 \text{ U Dam} = 0{,}083 \text{ μg vit. } K_1 = 0{,}14 \text{ μg vit. } K_2 = 0{,}004 \text{ μg vit. } K_3.$$

Unitatea standard în aprecierea activității vitaminelor K este 1 μg vitamină K_3 (menadiona). Vitamina K_3 de sinteză este de 3 ori mai activă decât vitamina K_1 și de 6 ori decât vitamina K_2.

Unitatea de vitamină K se exprimă frecvent în unități Dam. Un gram de vitamina K este egal cu 2107 unități Dam. Un μg menadionă este egal cu 244 unități Dam:

1 U Dam = 0,14 μg vit. K_2 sau 0,04 μg vit. K_3.

5.5. RĂSPÂNDIRE ȘI NECESITĂȚI

Vitaminele K sunt biosintetizate numai de organismele vegetale și de unele microorganisme astfel încât și răspândirea lor în natură predomină în regnul vegetal și în microorganismele din tubul digestiv al omului și al animalelor. La plante vitaminele K sunt sintetizate în cloroplaste, iar conținutul lor este mai mare în frunze, plantule, muguri și mult mai redus în fructe și rădăcini. Cea mai mare cantitate de vitamine K naturale se găsește în frunzele verzi de lucernă, spanac, urzică, cu un conținut mediu cuprins între 200—500 U Dam/g. Canti-

Scanned with OKEN Scanner

tăți mai mici conțin cartofii, pătlăgelele, boabele verzi de mazăre și de soia. Frunzele expuse la lumină au un conținut mai mare de vitamine K decât cele crescute la umbră. În tabelul 5.2 se prezintă conținutul vitaminelor K din unele produse vegetale și animale. Conținutul vitaminelor K variază în făina de lucernă uscată artificial între 21,5 și 30,4 µg g U Dam, iar lucerna uscată la soare conține doar 13,0—18,4 µg/g U Dam, fapt ce denotă că în timpul uscării la soare a furajelor se pierd cantități însemnate de vitamină K. Frunzele plantelor verzi au un conținut mai ridicat de vitamina K decât drojdiile și ciupercile comestibile.

În organismele animale vitaminele K sunt puțin răspândite, iar unele lichide biologice sunt lipsite de aceste vitamine. Cele mai mari cantități de vitamina K se găsesc în ficatul de porc, apoi în mușchiul de pui, în carnea de vită, oaie și porc.

Necesitățile omului și a animalelor sunt greu de stabilit întrucât o parte din vitaminele K se procură prin hrană, iar o altă parte însemnată sunt biosintetizate de microorganismele din tubul digestiv. Sursa endogenă fiind chiar mai importantă la unele specii decât sursa exogenă. Noii născuți au însă nevoie de aport alimentar de vitamină K aproximativ 30 mg/zi timp de 3—4 zile, întrucât intestinul lor este slab populat cu floră bacteriană.

Necesitățile zilnice pentru omul adult sunt apreciate de mai mulți cercetători între 1 și 2 mg, dintre care 1—1,5 mg sunt biosintetizate pe

Tabelul 5.2

Conținutul vitaminei K din diferite produse vegetale și animale, în µg/g produs proaspăt

Produs	Vitamina K, µg/g
Lucernă	65
Spanac	60
Urzici	50
Varză albă	36
Conopidă	40
Fasole	35
Mazăre verde	30
Tomate coapte	30
Soia	25
Ulei de arahide	15
Măceșe	4,0
Sămânță de cânepă	4,5
Grâu, porumb	1,5—0,5
Fragi, orez boabe	1,0—0,5
Ficat de porc	4 —9
Mușchi de pui	2
Carne de vită	2
Carne de oaie	2
Carne de porc	2
Ficat de găină	0,1
Lapte uman	0,2—0,1
Grăsime de pasăre	0,01

Scanned with OKEN Scanner

zi de flora intestinală, care asigură astfel singură nevoile oamenilor în vitamina K, așa încât sursa din hrană poate fi considerată un supliment.

Carența în vitamina K apare la om în cazuri de dereglare a absorbției lipidelor sau în cazul unor boli hepatice sau infecții cronice intestinale, precum și prin administrarea de antibiotice și sulfamide care inhibă activitatea florei intestinale dacă sunt administrate 3 sau 4 săptămâni. Pentru refacerea florei intestinale după aceste tratamente este necesar să se adauge zilnic în hrană 0,03 mg/kg corp vitamină K, o anumită perioadă de timp, până la refacerea concentrației acestei vitamine în sânge.

La om și la animale, flora microbiană din tubul digestiv este o sursă endogenă importantă pentru biosinteza vitaminelor K. La unele animale și păsări, flora microbiană acoperă necesitățile organismului sănătos. La sugari principalul furnizor de vitamina K o reprezintă *Escherichia coli*. În tabelul 5.3 se prezintă cele mai importante microorganisme care biosintetizează vitamina K.

O parte din vitamina K biosintetizată la nivelul tubului digestiv se elimină prin fecale. Coprofagia unor animale reprezintă o sursă însemnată pentru procurarea vitaminelor K. Administrarea de antibiotice și de sulfamide diminuează foarte mult microflora bacteriană din tubul digestiv și deci și biosinteza acestor vitamine pe cale biogenă. Necesarul de vitamina K la animale depinde de felul speciei, vârstă, stare fiziologică etc. Șobolanul necesită 2,0 μg/kg corp de 2-metil-naftochinonă, câinele 0,9 μg/kg corp de vitamina K_1, iar găina 0,5 μg/kg corp menadionă.

Tabelul 5.3

Principalele microorganisme care biosintetizează vitamina K, în UI/g

Microorganism	Cantitate UI/g
Bacillus subtilis	190
Bacillus mycoides	155
Bacillus cereus	115
Sarcina luteea	100
Bacillus proteus	75
Staphylococcus aureus	60
Mycobacterium tuberculosis	55
Bacillus flexeneri	30
Bacillus aerogenes	20
Escherichia coli	15

Scanned with OKEN Scanner

5.6. ABSORBȚIE, EXCREȚIE ȘI BIOSINTEZĂ

Vitaminele K sunt absorbite la nivelul intestinului subțire, unde ajung atât prin intermediul hranei, cât și prin intermediul florei bacteriene din intestinul gros, locul de biosinteză a acestora. În felul acesta omul și animalele sunt permanent aprovizionate cu cantități suficiente de vitamina K necesară proceselor metabolice.

Vitaminele K naturale sunt liposolubile, iar pentru absorbția lor prin intestin este necesară prezența bilei, în special a acidului dezoxicolic și a sucurilor pancreatice. Este necesară de asemenea o bună digestie și absorbție a grăsimilor alimentare și o bună funcționare a ficatului și pancreasului. Compușii hidrosolubili cu acțiune vitaminică K pot fi absorbiți din intestin și în absența sărurilor biliare. Mecanismul absorbției vitaminelor naturale este similar cu cel al vitaminelor E. După absorbție vitaminele K ajung inițial în limfă și apoi în sânge, fiind transportate la diferite țesuturi și organe în stare liberă și cu ajutorul proteinelor plasmatice.

Conținutul cel mai mare al vitaminelor K liposolubile din sânge este maxim după două ore de la administrarea orală a acestora. La scurt timp însă se produce o scădere rapidă a conținutului vitaminelor K din sânge. La șobolan, la două ore după administrarea unei doze marcate de vitamina K_1 pe cale orală, 78% din radioactivitatea inițială s-a găsit în ficat. La 24 de ore de la administrarea dozei, radioactivitatea reprezenta în ficat doar 44% din cea inițială, în musculatură era de 29% iar în piele 13%. Cantitatea de radioactivitate excretată prin urină a fost foarte mică, de 4,8% în 72 de ore. Vitaminele K se găsesc în cantitate mai mare în ficat și mușchi. În sânge, lapte, ouă și în grăsimea de depozit se găsesc în cantitate mai mică. Sunt eliminate din organism în cea mai mare parte prin fecale, iar în cantități mici și prin lapte, urină, ouă, piele etc.

În cazul unor insuficiențe hepatice sau a unor afecțiuni intestinale absorbția este dereglată și după o anumită perioadă, relativ scurtă, apar simptomele avitaminozei K. Datorită acestor dereglări de absorbție, tratamentele cu vitamina K administrate oral trebuiesc asociate cu administrarea de săruri biliare. Vitaminele sintetice (K_3—K_7), care sunt hidrosolubile, pot fi absorbite și în absența sărurilor biliare, întrucât sunt hidrosolubile. Ele nu se depozitează în ficat, iar excesul lor se elimină prin urină sub formă de esteri sulfurici sau glucuronoconjugați. Vitaminele K de sinteză după absorbție trec direct în sânge.

Prin alte experiențe, cu injectarea unor doze mari de vitamina K marcată, la puii de găină și șobolani, aceasta s-a regăsit în cea mai mare parte (70%) în ficat, splină și mai puțin de 1% în rinichi și plămâni. În sânge de asemenea se află într-o cantitate mică, de 1—2%, ea reprezentând practic vitamina K de transport pentru metabolizare. Cu excepția ficatului, nu există organe în care vitamina K să se depoziteze în cantități mari. Cea mai bogată sursă naturală de vitamina K o reprezintă ficatul de porc, iar cu un conținut mai scăzut carnea de pește, vită, pasăre și porc.

Vitamina K trece greu bariera placentară, fapt pentru care la noii născuți apar frecvent hemoragii. Vitamina K prezentă în fecale reprezintă în cea mai mare parte produsul de biosinteză a florei intestinale.

Scanned with OKEN Scanner

Cercetările asupra metabolizării 2-metil-1,4-naftocinonei au arătat că aceasta se reduce în organism în diferite organe și țesuturi, în hidrochinona corespunzătoare, care se elimină prin urină sub formă de ester sulfuric al naftohidrochinonei (1-sulfat-2-metil-1,4-naftohidrochinona (fig. 5.10).

Puține se cunosc despre catabolismul mai intim al vitaminelor; *K. O. Wiss* și *U. Gloor* au identificat, în 1966, fitomenadione în urină, ficat și rinichi. Alte studii cu vitamina K_1 marcată, susțin că aceasta traversează bariera placentară, dar în proporții mai reduse. În ce privește procesele catabolice, cercetări mai noi au arătat că vitaminele K suferă în ficat o biotransformare. Catena laterală de la C-3 este înlocuită cu o catenă tetraprenil, formându-se compusul MK_4. Concomitent se produce reducerea compușilor chinonici în compuși hidrochinonici, sub acțiunea NADH și NADPH. Are loc de asemenea o degradare a catenelor laterale cu formare de acizi (CH_3-CO_2SCoA) sau lactone. O parte dintre grupările hidroxilice ale compușilor hidrochinonici se vor conjuga cu acizii sulfuric sau glucuronic și se vor elimina sub această formă de esteri prin urină.

Prin administrarea vitaminei K_3 marcate cu ^{14}C în hrana animalelor de experiență, aceasta s-a găsit în vitamina K_2 din organismele animalelor, fapt ce denotă că vitaminele naturale se formează din compuși 2-metil-1,4-naftochinonici sau hidrochinonici și din catenele laterale. Acestea fiind compuși izoprenici de naturaă terpenică, se formează pe calea generală de biosinteză a terpenoidelor, având ca principali compuși intermediari izopentenilpirofosfatul cu C_5, geranil-pirofosfatul cu C_{10}, farnesilpirofosfatul cu C_{15}, geranilgeranil-pirofosfatul cu C_{20}, scualenpirofosfatul cu C_{30} etc. Vitaminele K cu activitate biologică maximă conțin catene laterale formate din C_{20}—C_{30}. Fitolul servește la biosinteza vitaminei K_1, iar difarnesilul la biosinteza vitaminei K_2. In mod similar se formează catena laterală a ubichinonei (coenzima Q). Dintre compușii intermediari o importanță mai însemnată o au geranilgeranilpirofosfatul. Lungimea catenelor cu C_{20} sau C_{30} se poate realiza prin combinarea acestora cu izopentilpirofosfat. Mecanismele mai intime de biosinteză a vitaminelor K naturale în clorplaste și în microorganisme sunt încă puțin cunoscute. Cu toate acestea, prin experiențe pe medii artificiale s-a stabilit că vitaminele K_2 sunt sintetizate de *Bacillus mycoides, B.cereus, B.subtilis, Sarcina luteea, Staphylococcus aureus, Mycobacterium tuberculosis*, care formează și ftiocolul, compus cu nucleu naftochinonic. În procesul de biosinteză se pare că se formează la început nucleul hidrochinonic, a cărei grupare OH este sub-

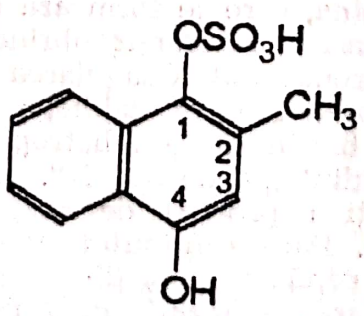


Fig. 5.10. Structura esterului sulfuric al 2-metil-1,4-naftohidrochinonei

stituită de izopentenilpirofosfat. Apoi se formează 2-metil-1,4-neftochinona, de care se leagă la C-3 catena laterală caracteristică. La plante predomină fitilul (C_{20}), iar la mamifere digeranilul (C_{20}). La microorganismele *Bacillus subtilis, B.megatherium, Staphylococcus albus,* catena este formată din farnesil-digeranil, cu C_{35}. La microorganismele *Escherichia coli, Proteus vulgaris, Sarcina luteea* se întâlnește o catenă laterală formată din 3-farnesilpirofosfat cu C_{45}, iar la *Mycobacterium tuberculosis* cu C_{50}, formată din pentageranilpirofosfat. *Proteus vulgaris* și *Escherichia coli* sintetizează ubichinone și vitamina $K_2(40)$ care conțin catene laterale formate din 10 și respectiv 8 unități izoprenice.

Ficatul prezintă o mare importanță pentru vitaminele K atât ca principal organ de depozit, cât și prin secreția bilei necesară absorbției din intestin (în special în jejun) și ca sediu al formării protrombinei. Întrucât capacitatea de depozitare a vitaminelor K este mică, iar metabolizarea acestora se realizează destul de rapid, în lipsa florei intestinale, simptomele caracteristice hipovitaminozei K apar repede, după 24—36 ore de la carențare.

5.7. ROL ȘI ACȚIUNE BIOLOGICĂ

Rolul esențial al vitaminelor K la om și la animale se manifestă prin menținerea normală a capacității de coagulare a sângelui și biosinteza protrombinei în ficat.

Vitaminele K au de asemenea un rol însemnat în procesele de oxidoreducere din celule și țesuturi, în oxidarea fosforolitică, formarea compușilor macroergici, în fotosinteză, biosinteza colesterolului, a mARN etc.

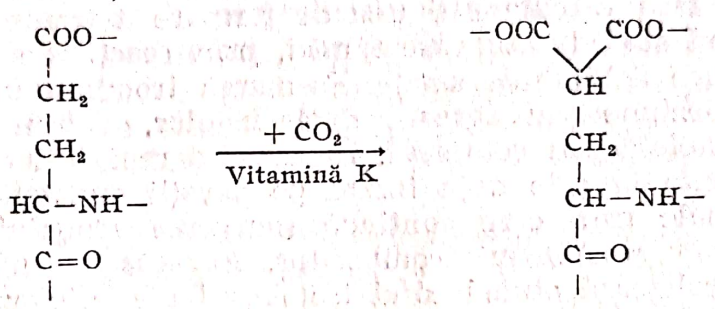
5.7.1. ROLUL VITAMINELOR K ÎN COAGULAREA SÂNGELUI

Cel mai specific și mai important rol al vitaminelor K îl constituie controlul acestora asupra coagulării sângelui prin intermediul protrombinei. Cu toate că vitaminele K nu intră în structura protrombinei și sunt lipsite de eficiență „in vitro", între aceste substanțe există o strânsă interdependență. În stări carențiale ale vitaminelor K scade în mod accentuat conținutul protrombinei, fapt ce are consecințe mărirea timpului de coagulare a sângelui și apariția hemoragiilor.

În procesul de coagulare a sângelui, un rol important îl are trombokinaza, care se formează din trombotropină (preprotrombină) și protrombokinază, apoi trombina, care se formează din protrombină și Ca^{2+} sub influența trombokinazei și în sfârșit fibrina, care rezultă din combinarea trombinei cu fibronogenul. Coagularea completă a sângelui se realizează odată cu formarea fibrinei stabile, a chiagului de sânge. Vitaminele K influențează biosinteza trombotropinei, biosinteza protrombinogenului prin intermediul „factorului X". Ele stimulează biosinteza și a altor factori implicați în procesul de coagulare a sângelui, pe care îl vom prezenta ulterior. Dacă conținutul protrombinei și a celorlalți factori coagulanți scade până la 25% din valoarea lor normală, apar hemoragii prin necoagularea sângelui. Prin cercetări mai recente se afirmă că vitaminele K ar interveni în biosinteza protrombinei, ulterior

Scanned with OKEN Scanner

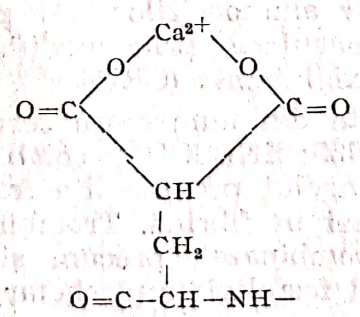
formării protrombinei sub influența mARN, care pătrunde în membrana reticulului endoplasmatic unde concomitent se produce transformarea nucleului 1,4-naftochinonic a vitaminelor K în nucleu hidrochinonic sub influența vitamin-K-NADH-dependente. Sub această formă, nucleul hidrochinonic în prezența CO_2, a O_2 și a vitaminei K, determină carboxilarea selectivă a unor resturi de acid glutamic (Glu) din preprotrombină, cu formarea acidului γ-carboxiglutamic (Gla), prezent în diferite trombine. În cursul procesului de carboxilare a acidului glutamic se formează nucleul 1,4-naftochinonic, care va putea participa la un nou ciclu de carboxilări. Carboxilarea acidului glutamic se face cu CO_2, în microzomii ficatului, sub acțiunea catalitică a carboxilazei, în prezența O_2, cu ajutorul vitaminei K, care îndeplinește rolul de cofactor al enzimei. Procesul de carboxilare se prezintă schematic prin următoarea reacție:



Acid glutamic — Acid γ-carboxiglutamic

Preprotrombina carboxilată leagă resturi glicozidice și sialice, sub acțiunea glucoziltransferazei, formându-se astfel protrombina stabilă, care trece în plasmă (R. F. OLSON, J. W. SUTTIE, 1977, 1978; BEDELEANU, 1985).

Formarea acidului γ-carboxiglutamic este blocată de acțiunea unor antivitamine K. Acidul γ-carboxiglutamic din protrombină are capacitatea de a lega ionii de Ca^{2+}, asigurând transportul acestora la suprafața membranelor biologice (fosfolipidice) și stimulează totodată activitatea proteolitică din celule și țesuturi. Protrombina (care conține până la 10 resturi de acid γ-carboxiglutamic), poate capta ionii de calciu la nivelul grupărilor libere ale acizilor γ-carboxiglutamici, cu formarea de chelați de calciu, care au un rol important în procesul de coagulare. Structura γ-carboxiglutamatului de calciu se prezintă astfel:



Pe lângă factorii de coagulare există și alte proteine care conțin resturi de acid γ-carboxiglutamic formate în oase (osteocalcina), placentă, plămâni, splină, rinichi. Proteinele ce conțin acizi carboxigluta-

mici contribuie și la reglarea conținutului ionilor de calciu din sânge și din sistemul osos. Dintre aceste proteine, a căror biosinteză este dependentă de acțiunea vitaminelor K, face parte osteocalcina, torinată din 54 de aminoacizi, dintre care patru sunt acizi glutamici carboxilați, izolată din oasele puilor de găină.

Împotriva hemoragiilor din organism se opune homostazia, care este un proces de apărare opus hemoragiilor. În homeostazia spontană a unei hemoragii intervin factori vasculari, plachetari și plasmatici, care se condiționează reciproc. Factorii vasculari și cei plachetari au fost regrupați sub denumirea de hemostază primară, iar cei plasmatici sub cea de coagulare propriu-zisă.

Hemostaza constă în formarea unei pelicule de fibrină, care acoperă endoteliul vaselor cu hemoragii care s-au fibrinolizat, dar care se pot reface în mod continuu. Hemostaza primară durează 2—3 minute și are o fază vasculară și una de formare a trombosului. În faza vasculară, când sunt lezate vasele mici, prin reacții de vasoconstricție activă se reduce debitul de sânge. Formarea trombosului alb se realizează prin adeziune sau agregarea plachetelor, a trombocitelor, care poate fi incompletă sau completă. În cazul agregării incomplete aderă unele trombocite la cele deja fixate pe pereții endoteliali ai vaselor, rămânând canale prin care continuă scurgerea sângelui, cu toate că intervin și Ca^{2+} și ADP-ul trombocitar. Agregarea completă sau ireversibilă se realizează atunci când trombosul plachetelor acoperă complet mucoasa vasculară lezată a endoteliului. Se formează astfel o cantitate mai mare de trombos alb, care acoperă toate canalele, fiind necesară prezența trombinei (ENESCU, 1990).

În faza coagulării propriu-zise (timpul sau faza plasmatică) are loc hemostaza definitivă, permanentă. Coagularea sângelui se realizează prin acțiunea mai multor factori dintre care menționăm: fibrinogenul (Factor I), protrombina (Factor II), tromboplastina tisulară (Factor III), ionii de calciu (Factor IV), proaccelerina (Factor V), accelerina (Factor VI), proconvertina (Factor VII), globulina antihemolitică A (Factor VIII), factorul Christmas (Factor IX), factorul Stuart (Factor X), factorul Rosental (Factor XI), factorul Hogeman (Factor XII), factorul fibrinostabilizant (Factor XIII). Toți acești factori proteici ai coagulării sunt biosintetizați în ficat, majoritatea sub forma unor precursori inactivi, care devin activi sub influența vitaminei K. Vitaminele K intervin de asemenea ulterior procesului de traducere a mesajului mARN în secvența aminoacizilor din proteinele specifice, care reprezintă factorii de coagulare, prin modificarea resturilor de acid glutamic în acid γ-carboxiglutamic (CRISTEA POPA E. și col., 1991).

Așa după cum rezultă din numeroase cercetări (ZAESLEIN, 1982; BELELEANU și colab., 1985; ENESCU și colab., 1990; CRISTEA POPA, 1991 etc.). coagularea sângelui provine din transformarea fibrinogenului sub acțiunea trombinei în fibrină. Trombina provine din protrombină sub acțiunea protrombinazei, precum și a factorilor plasmatici ai coagulării, a factorului fosfolipidic plachetar, a ionilor de calciu și a vitaminei K.

Chiagul propriu-zis se formează sub acțiunea tromboplastinei active (protrombinaza), care este un complex enzimatic format din factorul X activat, factorul V (proaccelerina), factorul III plachetar (trom-

Scanned with OKEN Scanner

boplastina tisulară), Ca^{2+} și vitamina K. Urmează apoi transformarea protrombinei (factor II) în trombină, sub influența trombokinazei în prezența factorilor VI, VII, X. Menționăm că pentru biosinteza în ficat a factorilor VI, VII, IX și X este necesară prezența vitaminei K, transformarea fibrinogenului în fibrină, care se polimerizează în fibrină solubilă, instabilă (fibrina S). Această fibrină se transformă apoi sub acțiunea factorului XIII activat de trombină în fibrină insolubilă, stabilă.

Urmează apoi procesul de fibrinoliză, care duce la dispariția chiagului de fibrină „ in vivo“ și „in vitro“. Dacă chiagul de sânge s-a format în capilare sau vase mici, prin fibrinoliză se realizează desobsturarea vaselor sanguine, proces deosebit de important în tratamentul emboliilor.

Mecanismul intim de acțiune a vitaminelor K în procesul de biosinteză a factorilor II, VII, IX, X încă nu este pe deplin cunoscut, precum nici rolul acestora în procesul de formare a pretrombinei sau în transformarea unor precursori inactivi în factori coagulanți activi.

În stări carențiale ale vitaminei K se produce o hipoprotrombinemie, care determină o scădere a timpului de coagulae a sângelui, cu apariția a diverse tipuri de hemoragii (hematemeze, melenă, epistaxis, gingivite etc.).

Procesul de coagulare a sângelui și locul de acțiune a vitaminei K în acest proces se prezintă în figura 5.11.

Acțiunea vitaminei K în coagularea sângelui se exercită atât asupra concentrației protrombinei din sânge, cât mai ales asupra factorului VII (proconvertina). Experimental s-a confirmat că mitocondriile hepatice tratate cu factorul VII și vitamina K formează protrombina. Vitaminele K sunt necesare sistemelor enzimatice care mențin timpul normal de coagulare a sângelui. Aprecierea stării de avitaminoză K se bazează pe determinarea timpului minim de coagulare a sângelui.

5.7.2. ROLUL VITAMINELOR K ÎN PROCESE DE OXIDOREDUCERE

Vitaminele K datorită ușurinței cu care compușii 2-metil-1,4-naftochinonici trec reversibil în compuși 2-metil-1,4-naftohidrochinonici, au un rol însemnat în reglarea proceselor de oxidoreducere din celule și țesuturi, reușind să asigure transportul hidrogenului pe cale neenzimatică (fig. 5.12.).

Vitaminele K participă în procesul de oxidare fosforolitică, reușind să influențeze cuplarea oxidării, cu degajare de energie, cu fosforilare, proces ce înmagazinează energia chimică în legăturile macroergice ale diferiților compuși.

Experimental s-a demonstrat că mitocondriile izolate din ficatul de șobolan, iradiate cu raze UV, posedă o capacitate de fosforilare redusă, care se restabilește prin adăugarea de vitamină K. *K. Martius* consideră că vitaminele K îndeplinesc rolul de cofactori în procesele de oxidare fosforolitică. În avitaminoza K fixarea fosforului în compuși organici este scăzută. Cu ajutorul izotopilor radioactivi s-a dovedit în mod convingător că vitamina K are capacitatea de a reface fosforilarea oxidativă la puii de găină aflați în stare de hipovitaminoză. În stări carențiale atât la puii de găină cât și la șobolani și iepuri este

Scanned with OKEN Scanner

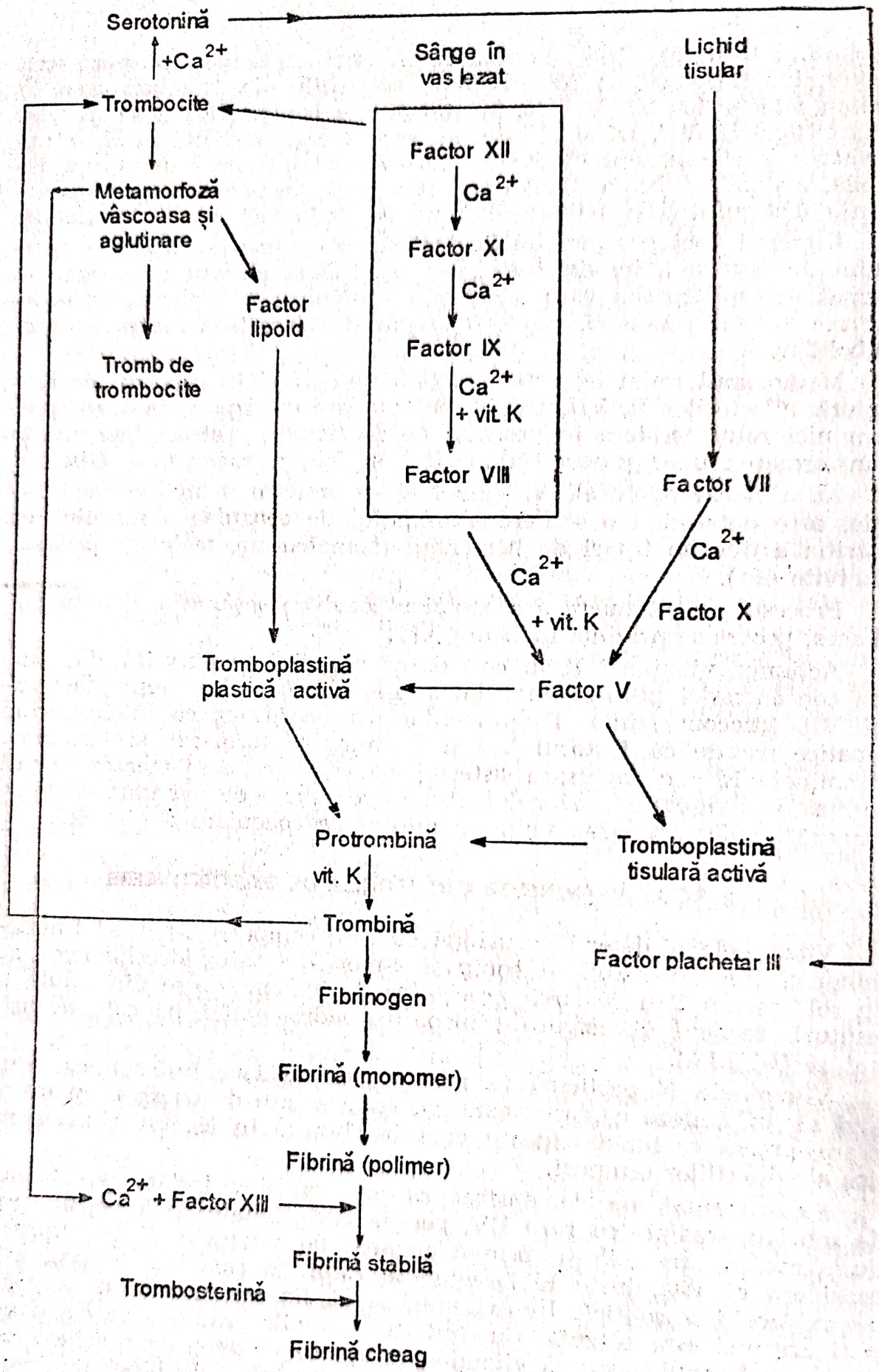
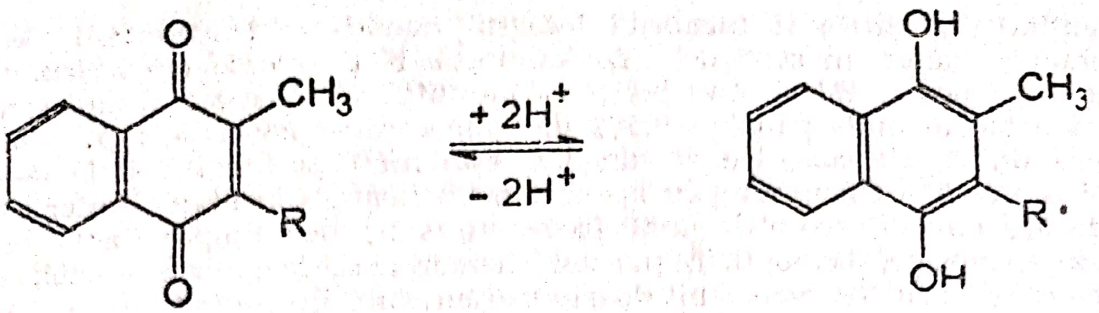


Fig. 5.11. Intervenţia vitaminelor K în procesul de coagulare a sângelui (după ENESCU, 1990)

Scanned with OKEN Scanner



forma chinonică
(forma oxidată)

forma hidrochinonică
(forma redusă)

Fig. 5.12. Sistemul redox al vitaminelor K

scăzut randamentul oxidării fosforolitice. Formele chinonice ale vitaminelor K stimulează fosforilarea ciclică, care determină biosinteza ATP.

Prin reacții de oxidoreducere, vitaminele K iau parte la transformarea grupărilor tiolice -SH în grupări disulfurice, -S-S-, proces care stă la baza formării unor scleroproteine (keratină, colagen) și a transformării fibrinogenului, care conține grupări -SH în fibrină ce are grupări -S-S-, cu care asigură stabilitate fibrinei și chiagului sanguin. Nu s-au obținut date sigure în ce privește rolul de coenzimă a vitaminei K în procesul de biosinteză a protrombinei.

Vitaminele K participă în procesul respirației tisulare alături de ubichinone. În lanțul catenei de respirație ele se intercalează între coenzimele flavinice și citocromul b.

Vitaminele K au la pH 7 un potențial de oxidoreducere negativ (—0,05 V) fapt ce le imprimă o reactivitate chimică sporită. Filochinona oxidată, sub acțiunea filcchinonreductazei, poate oxida coenzime ca NADH, NADPH, $FADH_2$, iar filohidrochinona poate fi reoxidată de citocromii b și c. Vitaminele K participă de asemenea în transportul de protoni sau de electroni de la difenoli la acidul ascorbic sau la citocromul c, precum și de la glutation la chinone.

Dintre alte roluri biochimice ale vitaminei K menționăm proprietatea acesteia de a influența favorabil biosinteza colesterolului, a cărui concentrație în ficatul de șobolan crește prin adăugarea de filochinonă sau menadionă.

Vitaminele K au un rol însemnat în procesul de fotosinteză, atât ca transportori de electroni, cât și în procesul fotofosforilării ciclice. Ele contribuie alături de clorofile și alți compuși la formarea ATP-ului și a NADP-ului cu consum de energie luminoasă. Iau parte deci indirect la transformarea energiei luminoase în energie chimică.

5.8. HIPOVITAMINOZE ȘI HIPERVITAMINOZE K

Hipovitaminozele K apar foarte rar la oameni și la animale întrucât prin aportul alimentar și prin activitatea florei intestinale se asigură cantitatea necesară de vitamine K bunei funcționări a organismului. Pentru omul adult necesarul de vitamine K este 1—2 mg pe zi,

Scanned with OKEN Scanner

cantitate ce poate fi furnizată integral numai de flora intestinală a omului sănătos. În stări de hipovitaminoze K provocate sau apărute în urma unor dereglări metabolice, conținutul protrombinei din sânge scade foarte mult până la 0,5% din valoarea sa normală, fapt pentru care timpul de coagulae al sângelui este mult prelungit, de la 8—15 minute la 50—60 minute, cu apariția de hemoragii la nivelul diferitelor organe, dintre care cele mai frecvente sunt hemoragiile intestinale, nazale, melene, hemoptizii, purpura hemoragică, hematoame, epistaxis, hemoragii urinare care sunt foarte periculoase. La femeie, în perioada gravidității, hipovitaminoza K se manifestă prin hemoragii la nivelul pielii și a mucoaselor endoteliale, apar frecvent hemorgaii uterine, în regiunea articulațiilor, la cap, gât etc.

La puiul de găină timpul normal de coagulare a sângelui de 4—5 minute se prelungește în starea de hipovitaminoză K la 15—20 minute și uneori la câteva ore.

Hipovitaminoza K poate fi provocată prin înlăturarea bacteriilor intestinale care reprezintă sursa cea mai importantă de vitamine K pentru om și animale, apariția unor afecțiuni hepatice, intestinale, pancreatice, consumul mare de antibiotice, sulfamide sau antivitamine, care afectează absorbția vitaminelor și scăderea accentuată a biosintezei protrombinei, precum și lipsa de aport alimentar, factor de mai mică însemnătate.

Alterarea și diminuarea florei intestinale poate să apară atât în urma unor afecțiuni intestinale, cât și prin consumul mărit de substanțe antibiotice, sulfamide, aspirină, cumarină și derivați cumarinici, acid salicilic etc.

Tulburările de absorbție ale vitaminelor K apar în lipsa bilei și a sucurilor pancreatice, neabsorbția lipidelor alimentare și a celorlalte vitamine liposolubile, precum și în afecțiuni hepatice, pancreatice, intestinale. Dintre afecțiunile intestinale se pot menționa colite, enterite, diaree cronică etc. Bolile hepatice au o influență majoră în producerea stărilor de avitaminoză deoarece la nivelul ficatului are loc biosinteza protrombinei și a celorlalți factori necesari coagulării sângelui, cât și producerii bilei și sărurilor biliare necesare absorbției grăsimilor și compușilor liposolubili. Dintre afecțiunile hepatice mai grave, cu influență asupra vitaminelor K fac parte icterele, leziunile parenchimului hepatic, hepatite toxice, hepatite virotice, ciroze trofice etc. Blocarea biosintezei protrombinei poate surveni și prin consum de antivitamine K (cumarine, dicumarol, diftiocol), prin terapie îndelungată cu salicilați, aspirină, acid paraaminobenzoic, fiind însoțită uneori și de apariția hemoragiilor gastrointestinale. Hipovitaminozele K mai pot apare în urma unor boli infecțioase (pneumonie, TBC-pulmonar etc.) stări febrile prelungite, în urma unor tratamente antiinfecțioase, în chimioterapie, în urma deratizărilor cu warfarin etc., precum și în stări de hipoprotrombinemie congenitală, în deficitul genetic al unor factori de coagulare etc.

Întrucât „viața biologică" (T1/2) a protrombinei este foarte scurtă, de numai câteva ore, este necesară biosinteza sa permanentă și o concentrație normală și constantă a conținutului vitaminelor K din sânge și ficat. În stări de hipovitaminoză K o doză de 0,03 mg vitamină K

Scanned with OKEN Scanner

dată zilnic intravenos/kg greutate corp, asigură biosinteza protrombinei și reglează timpul de coagulare a sângelui.

Hipovitaminozele K apar frecvent la noii-născuți deoarece majoritatea se nasc fără rezerve de vitamine K (sau foarte reduse), deoarece intestinul lor este lipsit de flora intestinală, iar trecerea vitaminelor K prin placentă este extrem de redusă. Din această cauză nivelul protrombinei în primele 3—4 zile reprezintă aproximativ 10—30% din necesar, fapt pentru care 1 din 150 noi născuți prezintă sângerări la nivelul cordonului ombilical, nasului, retinei, ligamentelor, tubului digestiv, creierului. Pentru prevenirea mortalității neonatale este indicat să se dea mamei 2—5 mg/zi vitamina K sau copilului 1 mg/zi. Este preferabil a se da mamei, cu 8—10 zile înainte de naștere alimente bogate în verdețuri. La noii născuți, flora intestinală producătoare de vitamina K se formează în timp de 4—10 zile de la naștere. Pentru a preveni apariția hemoragiilor intestinale și intracraniene (care sunt foarte periculoase) și ale pielii din jurul brațelor, ale ombilicului, nasului, se administrează noilor născuți câte o fiolă a 1 ml soluție 1% zinc, timp de 3 zile în scop profilactic. La bolnavi înainte de operarea acestora, se impune cu necesitate determinarea timpului de coagulare și de protrombină, pentru a se înlătura hemoragii postoperatorii cauzate de hipoprotrombinemii necunoscute.

Hipovitaminoza K apare mai frecvent la păsări, în cazul unui aport exogen mai slab, întrucât sursa endogenă este mai săracă, deoarece păsările au intestin mai scurt și floră intestinală mai redusă. După 10—15 zile de la administrarea hranei fără vitamine K, apar la puii de găină pete hemoragice pe picioare, piept, abdomen, aripi, iar fecalele au o culoare roșietică. La smulgerea penelor apar pete hemoragice.

Testele clinice de stabilire a avitaminozei K constau în determinarea timpului de sângerare, a timpului de coagulare și a timpului de protrombină.

Tratamentele cu vitamina K se fac și în cazul hemoragiilor de origine necunoscută și în toate afecțiunile care dereglează coagularea normală a sângelui. În scopuri profilactice se administrează noilor născuți (1 mg vitamina K_1, trei zile) și gravidelor înaintea nașterii cu 8—10 zile (10—20 mg/zi, oral). Vitaminele K se dau și pacienților sub tratament cu anticoagulanți de tipul dicumarolului, precum și celor cu afecțiuni hepatice (hepatopatii), care afectează atât biosinteza protrombinei, cât și absorbția grăsimilor și a vitaminelor liposolubile. Tratamentele cu vitamina K se fac și în scopul stimulării creșterii unor bacterii, întrucât vitaminele K reprezintă factori de creștere pentru numeroase bacterii din flora intestinală. Cercetări mai recente au descoperit acțiunea antiinflamatorie a vitaminelor K. Tratamentele cu vitamina K se fac în pregătirea preoperatorie, în boli hepatice, în chirurgia hepatică etc. Profilactic la femei gravide, prematuri si nou născuți nu se vor aplica tratamente cu vitamine K în cazul flebitelor, în stările tromboembolice. Vitaminele K_3, K_4, și K_5 au efecte fungicide, cu utilizări în dermatologie și pentru conservarea unor sucuri, siropuri, dulceață, a vinului, berii etc.

Hipervitaminoza E. Vitaminele naturale K_1 și K_2 în mod practic nu prezintă toxicitate. Șoarecii suportă doze de 25 g oral, iar subcutanat 12,5 g/1 kg corp, fără să manifeste simptome toxice. Vitaminele

Scanned with OKEN Scanner

lipsite de catena laterală au proprietăți toxice, fapt ce scoate în evidență acțiunea antitoxică a catenelor laterale. *Etiocolul* deși este un produs natural, cu structura 2-metil-1,4-naftochinonică, neavând catenă laterală prezintă toxicitate și o slabă activitate coagulantă a sângelui. Toate vitaminele K sintetice prezintă toxicitate care se manifestă prin depresiune respiratorie, cianoză, grețuri și vomă, convulsii, albuminurie, porfirinurie, anemie etc.

La șoarece menadiona administrată în doze mari determină o prelungire a timpului de coagulare a sângelui, apariția de hemoragii, efecte inverse aplicării acestei vitamine în doze mici. Ftiocolul, administrat în doze de 0,2—0,5 mg/kg corp produce moartea șoarecilor în timp ce vitaminele K_1 și K_2 sunt suportate de aceleași animale în doze de 25 g/kg corp.

Doza minimă toxică, exprimată în g/kg corp viu, este peste 26 g pentru vitamina K_1, de 0,6 g pentru K_3, 0,3 g pentru K_4 (menadiol), 9,3 g pentru menadiol diacetat, 9,8 g pentru menadiol dibutirat, 18 g pentru menadiol diizovalerat, 0,14 g pentru 1,4-naftochinonă și 0,2 g pentru ftiocol.

La om, administrarea per os a unor doze de 180 mg/kg corp vitamina K_3 au produs grețuri, vărsături și porfinurie. La câine au apărut aceleași simptome la administrarea unor doze de 30—60 mg/kg corp.

Dintre vitaminele K cea mai bine tolerată de om și copii este vitamina K_1. Cu toate acestea nu este indicat a se da noilor născuți doze mai mari de 5 mg în primele 5 zile de la naștere pentru a nu influența imaturizarea sistemului enzimatic din ficat. Nu s-au semnalat cazuri de hipervitaminoză K_1 la oameni și la animale. Ocazional s-au semnalat totuși dureri de cap, dureri în piept, călduri după injecții intravenoase cu fitomenadionă. Aceste efecte nu trebuiesc imputate acțiunii vitaminei K_1 ci substanțelor emulsionante folosite pentru solubilizare. De aceea administrarea vitaminelor K pe cale intravenoasă trebuie rezervată numai pentru cazuri grave, în care acțiunea rapidă a vitaminelor este esențială.

5.9. INTERACȚIUNI CU ALTE VITAMINE ȘI CU MEDICAMENTE

În stări de hipervitaminoză A provocată la șobolani, administrarea de vitamină K nu are eficiență asupra coagulării sângelui. La puii de găină aflați în stare carențială de vitamina K conținutul vitaminei C nu este mult scăzut. Prin administrarea de vitamine K concomitent cu înlăturarea simptomelor de hipervitaminoză, crește foarte mult și conținutul vitaminei C. Alte observații menționează că în hipervitaminoza A se produce o hipotrombinemie.

În perioada afecțiunilor de scorbut s-a observat o prelungire a timpului de protrombină, care revine la normal prin administrarea vitaminei K. În ce privește interrelațiile dintre vitaminele K și D, s-a remarcat că tendința de hemoragii în cursul operațiilor la hepatici cu icter sunt ușor prevenite sau vindecate prin administrarea de vitamine D. Vitamina K administrată în doze mici la șoricioaice în gestație, previne simptomele de avitaminoză E, provocate de α-tocoferolchinonă.

Uleiul de parafină adăugat în hrana animalelor de experiență determină o diminuare accentuată a absorbției vitaminelor K, instalarea

stării de hipovitaminoză și potențarea efectului medicamentelor anticoagulante. Vitaminele K sunt incompatibile cu soluțiile injectate de fenitoină sodică și clorhidrat de promazină cu care formează precipitate. De asemenea sunt incompatibile și cu substanțele oxidante și sărurile de argint, sub acțiunea cărora se degradează cu ușurință. Vitaminele K nu se administrează bolnavilor aflați în stări tromboflebitice. Vitamina K poate fi utilizată și ca „substanță indicatoare", de diagnostic în afecțiunile hepatice. Dacă în stări de hipovitaminoză se administrează 30—50 mg/kg corp vitamine K hidrosolubile, timp de 4 zile se normalizează protrombinemia, hipovitaminoza este determinată prin carență de aport sau de absorbție, iar lipsa de răspuns în urma tratamentului efectuat, indică o afectare a parenchimului hepatic.

În tratamentele cu vitamine K trebuie să se țină seama că medicamentele laxative diminuează absorbția grăsimilor și a vitaminelor liposolubile în intestin, fapt ce determină instalarea hipovitaminozelor. Uleiul de parafină potențează efectul substanțelor anticoagulante prin micșorarea absorbției vitaminelor K. Prin asocierea substanțelor anticoagulante cu antibiotice (penicilină, streptomicină, kanamicină, neomicină etc.), administrate oral, apare riscul creșterii puternice a efectului hipocoagulant prin mecanisme de conjugare, atât în ce privește diminuarea absorbției vitaminelor K, scăderea biosintezei acestora de către flora intestinală, cât și prin competiția ce există între anticoagulanți și vitaminele K în ce privește legarea lor de proteinele plasmatice.

Întrucât coagularea sângelui este un proces complex, în timpul tratamentelor cu vitamine K sau cu substanțe coagulante, este necesară supravegherea permanentă a bolnavilor, prin determinarea timpului de coagulare și de protrombină, pentru evitarea hipo- și hipercoagulării sângelui, afecțiuni la fel de periculoase cu efecte rapide asupra vieții oamenilor.

Dintre preparatele farmaceutice principale, care se găsesc sub denumirea de „vitamina K" sau alte denumiri, fac parte următoarele:

Vitamina K_1, denumită și fitomenadionă sau filochinonă.

— *Konarion,* ce conține vitamina K_1 în soluție apoasă la pH 5—7,5. Fiolele de 1 ml conțin 10 mg vitamina K_1, fiind sterilizate prin autoclavare.

— *Konakinon,* care stimulează biosinteza în ficat a factorilor coagulanți II (protrombina), VII, IX, X, precum și sistemul enzimatic de biosinteză a vitaminei K_1. Inhibă biosinteza factorilor anticoagulanți. Konakinolul, produs de firma Hoffman La Roche, este un foarte bun antagonist pentru dicumarol și alți anticoagulanți. El nu neutralizează efectul heparinei.

— *Vitamina* K_1 naturală, obținută și prin sinteză, se folosește în tratamentele antihemoragice, întrucât stimulează biosinteza protrombinei și a altor factori coagulanți în țesuturile hepatice. Se folosește și în tratamentele intoxicațiilor cu anticoagulante cumarinice, în doze de 10—100 mg cu urmărirea timpului de protrombină.

— *Aquamephyton* (Merck), conține în fiole de 1 ml, 10 mg vitamina K_1, în soluție apoasă.

— *Menatetrenona,* conține vitamina K_2 și se prezintă sub forme de cristale galbene sau lichid uleios. Doza injectabilă este de 10—20 mg.

Scanned with OKEN Scanner

— *Vitamina* K_3 (menadiona) se găsește sub formă de tablete, ce conține 2—5 mg menadionă în ulei sau etiolat.

Dintre medicamentele cu acțiune asemănătoare vitaminelor K face parte și *acetomenaftona*, care se prezintă sub formă cristalină albă, cu gust amar, fără miros, ușor solubilă în alcool (ENESCU, 1990).

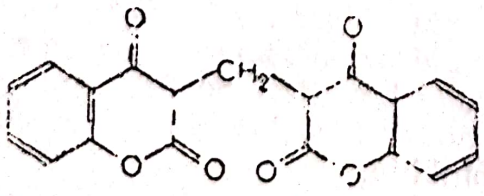
5.10. ANTIVITAMINE K

Majoritatea antivitaminelor K sunt analogi structurali cu vitaminele K, dar cu acțiune antagonistă. Cele mai puternice antivitamine K sunt cele care au o structură moleculară dublă, care rezultă din dublarea simetrică a ciclurilor. Dintre acestea, cele mai cunoscute sunt *dicumarolul* și *diftiocolul*, care au moleculă dublu simetrică (fig. 5.13).

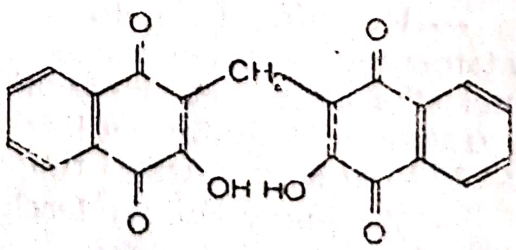
Aceste antivitamine, la fel ca și alte substanțe anticoagulante, sunt folosite în cazuri de tromboze (flebite, embolii, tromboflebite etc.), când este necesară întârzierea coagulării sângelui, sau dizolvarea rapidă a chiagurilor formate spontan, deoarece acestea provoacă accidente grave, deseori chiar moarte.

Dicumarolul se formează în furajele alterate, în mod deosebit în trifoiul și lucerna intrate în putrefacție. Ajuns în organismul animalelor, împiedică biosinteza protrombinei și a altor factori coagulanți în ficat și inhibă fosforilarea oxidativă la care ia parte și vitamina K, prin blocarea activității filochinonreductazei, decuplând astfel procesul oxidării de cel al fosforilării. În perioada anilor 1921—1922 s-a remarcat în unele regiuni din S.U.A. că vitele care consumau fânuri mucegăite, care conțineau mult *Melilotus alba*, prezentau hemoragii accentuate, uneori chiar mortale. Cercetările efectuate au relevat că hemoragiile se datoresc melilotoxinei, care este un produs de descompunere a cumarinei. Ulterior acest produs a fost obținut în stare cristalină fiind bis-hidroxi-cumarină, numită și dicumarol. În prezent, dicumarolul și derivatul său numit pelentan (etil- bis-cumaceat, fig. 5.14) se obțin prin sinteză și au o mare utilizare în terapeutică.

Întrucât dicumarolul, diftiocolul și pelentanul prezintă un plan simetric și rezultă din dublarea simetrică a ciclurilor, s-a conformat ipoteza că efectul lor antivitaminic K se datorează antagonismului prin analogie structurală. Prin experimentări ulterioare s-a constatat că din 150 de compuși cu acțiune antivitaminică K, 40 au un pronunțat efect anticoagulant și prezintă cicluri cu simetrie moleculară.



Dicumarol



Difticol

Fig. 5.13. Antivitamine K

Scanned with OKEN Scanner

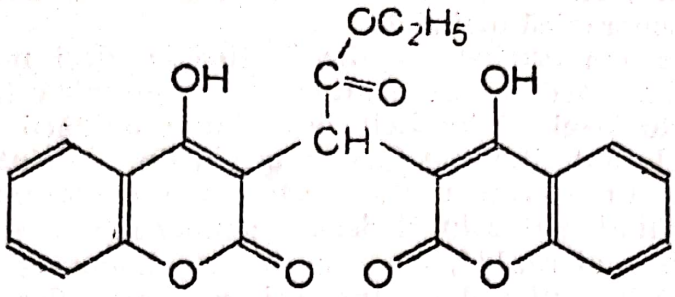


Fig. 5.14. Structura moleculară a pelenatului

Prin numeroase cercetări s-a constatat că prin înlocuirea grupării metilice de la C-2 din molecula vitaminelor K, sau a compușilor înrudiți cu acestea, cu grupări mai mari (fenil, hidrocarburi aromatice sau alifatice etc.) se obțin compuși antivitaminici. Efectul antivitaminic al acestor compuși este datorat în principal înlocuirii grupării metilice de la C-2 cu alți compuși. Radicalul $-CH_3$ de la C-2 al nucleului naftochinonic este esențial pentru activitatea vitaminelor K și ușurează fixarea vitaminelor K pe suprafața enzimelor. Analogia structurală, în special stările mezomere și tautomere dintre vitamine și antivitamine K se prezintă astfel:

	Mezomerie		Tautomerie
Vitamine K	$-C=C-CH_3$ (O)	$\rightleftharpoons$	$-C-C-CH_3$ (O)
Antivitamine K	$-C=C-R$ (O)	$\rightleftharpoons$	$-C-C-R$ (O)

Derivații cumarinici determină o mărire a timpului de coagulae a sângelui nu prin acțiunea lor directă, ci prin reducerea biosintezei protrombinei în ficat, împiedecând participarea vitaminei K în procesul de biosinteză a factorilor coagulanți.

Tratamentele cu antivitamine, administrate în doze de 200—300 mg/kg corp, nu devin eficiente imediat, ci numai după o perioadă de 24—66 ore. Tratamentul trebuie întrerupt când activitatea protrombinei scade sub 15—20%. Produșii cumarinei determină o scădere a capacității de aglutinare a plachetelor sanguine, prelungirea timpului de coagulare, crește timpul de reacție, iar cel de sângerare rămâne nemodificat.

Efectele toxice ale dicumarolului care apar în cazul administrării animalelor în doze mari, timp mai îndelungat, constau în diaree, vărsături, hemoragii la piele, mucoase, tub digestiv, etc. În perioada tratamentelor cu antivitamine K se impune supravegherea permanentă a bolnavilor, prin determinarea timpului de coagulare, spre a se evita apariția intoxicațiilor. Tratamentul cu anticoagulante se va suprima la primul semn de sângerare.

Diftiocolul, care este format din două molecule de ftiocol, unite printr-o punte metenilică, are de asemenea acțiune antivitaminică.

Scanned with OKEN Scanner

Ditiocumarolul, care are sulf în locul oxigenului heterociclic, prezintă o acțiune hemoragică mai slabă.

Tiroxina, hormon produs de glanda tiroidă, deși nu are înrudire structurală cu dicumarolul, are acțiune antivitaminică K prin inhibarea filochinonreductazei și implicit decuplarea oxidării de fosforilare. Dintre principalele antivitamine K și a produșilor de sinteză a acestora folosiți frecvent în terapeutică, face parte *Pelentanul*, denumit și *Tromexan*, care fiind mai solubil decât dicumarolul, prezintă o resorbție și o eliminare mai rapidă, iar perioada de latență este mai scurtă. Are o acțiune anticoagulantă de trei ori mai mică decât dicumarolul, de aceea și dozele administrate, pentru a fi eficiente, vor trebui să fie de trei ori mai mari. Un alt compus anticoagulant este *Fenindiona*, la care $-CH_3$ de la C-2 este înlocuit de fenil. Deși nu are o structură moleculară simetrică, activitatea sa antivitaminică este bună, iar doza de întrebuințare variază între 50 și 150 mg.

Trombostopul este un preparat farmaceutic anticoagulant care împiedică biosinteza factorilor coagulanți în țesutul hepatic. Acțiunea sa se manifestă după o perioadă de latență de 24—48 ore și se menține aproximativ 2—3 zile. Compusul *2,3-diclornaftochinona* este inhibitorul cel mai activ al drojdiilor, iar activitatea sa poate fi oprită prin administrarea de vitamina K.

Scanned with OKEN Scanner

Capitolul 6. VITAMINE F

6.1. Scurt istoric 163
6.2. Structură și proprietăți 164
6.3. Metode de dozare, necesități și activitate 165
6.4. Absorbție și transport 167
6.5. Răspândire în natură 168
6.6. Rol și activitate biologică 171
6.7. Hipovitaminoze și hipervitaminoze 172
6.8. Corelații cu alte vitamine, cu enzime și hormoni 173
6.9. Preparate farmaceutice 174
6.10. Antivitamine F. 175

Vitaminele F se mai numesc și vitamine *antidermatidice*, deoarece în lipsa lor din hrană apar tulburări metabolice la nivelul pielii.

Vitaminele F sunt formate dintr-un amestec de acizi grași esențiali, care conțin mai multe duble legături în moleculă și care nu sunt sintetizați de animale. Dintre aceștia, cei mai importanți și mai frecvent întâlniți sunt *acizii linoleic, linolenic* și *arahidonic*.

S-au purtat numeroase discuții dacă acești acizi nesaturați pot fi considerați ca vitamine adevărate sau vitagene, adică compuși naturali cu acțiune similară vitaminelor. Pentru încadrarea lor în grupa substanțelor vitagene pledează rolul lor structural și energetic în organism, conținutul lor mare în alimentația zilnică (10—20 g/zi) în organismul omului (total 500 g). S-a adoptat încadrarea acestor acizi în grupa vitaminelor întrucât în lipsa lor din hrană apar boli carențiale, sunt procurați de om și animale din hrană, sunt compuși indispensabili omului și animalelor, fiind utilizați în tratamente profilactice și curative, ei corespund noțiunii de *vitamine* sau de *acizi grași esențiali* (AGE).

Vitaminele F contribuie în proporție însemnată la biosinteza lipidelor complexe și a hormonilor prostaglandinici. Administrate omului, vitaminele F contribuie la vindecarea eczemelor și a altor afecțiuni dermatidice. Ele determină scăderea colesterolului din sânge și normalizează metabolismul grăsimilor la diabetici.

Scanned with OKEN Scanner

6.1. SCURT ISTORIC

Vitaminele F au fost descoperite în perioada anilor 1929—1930 de către *G. O. Burr* și *M. M. Burr*, care descriu pentru prima dată o boală de carență în grăsimi și acizi nesaturați la șobolani (BURR și colab., 1959). Acești autori au remarcat că șobolanii alimentați cu hrană lipsită de grăsimi se îmbolnăvesc. Apar tulburări cutanate, stagnarea creșterii, tulburări hepatice, renale și de reproducere, care însă dispar prin adăugarea în hrană a grăsimilor bogate în acizi grași polinesaturați, în special a acizilor linoleic, linolenic și arahidonic care împreună au fost denumiți vitamina F, respectându-se ordinea literelor din alfabet, întrucât s-au descoperit după vitaminele E. Afecțiunea determinată la șobolani de lipsa acestor acizi nesaturați din hrană s-a numit „boala de carență a grăsimilor". Omul și animalele nu pot biosinteza „de novo"-acizii grași polinesaturați, ci numai pe cei saturați și pe cei cu o dublă legătură în moleculă, fapt pentru care acizii grași polinesaturați se mai numesc și „acizi esențiali (AGE).

Prin cercetări experimentale s-a stabilit ulterior că și alte animale în afară de șobolani, pot suferi de „boala de carență a grăsimilor". La om lipsa acizilor grași din alimentație provoacă simptome de avitaminoze F, care sunt mai frecvente la copii și la bătrâni.

6.2. STRUCTURĂ ȘI PROPRIETĂȚI

Acizii grași polinesaturați cu două duble legături au formula generală C_nH_{2n} -4-COOH. Din această categorie face parte acidul linoleic, numit și acid linolic ($C_{18}H_{32}O_2$), cu formula structurală: CH_3-$(CH_2)_4$-CH=CH-CH_2-CH=CH-$(CH_2)_7$-COOH, iar formula prescurtată C_{18}:2(C-9, C-12), în care cifra 18 reprezintă numărul atomilor de carbon din moleculă, cifra 2 numărul de duble legături, iar în paranteză sunt trecuți atomii de carbon de la care începe dubla legătură. Numerotarea atomilor de carbon se face începând de la gruparea carboxilică spre capătul moleculei cu gruparea -CH_3.

Acidul linoleic sau *linolic* este larg răspândit în natură, în special în lipidele foliare. La temperatura de 20°C se prezintă ca un lichid incolor, insolubil în apă, solubil în solvenți organici și în soluții alcaline. Prezintă maxima de absorbție în lumina ultravioletă la 190 nm, se topește la 149,5°C și se solidifică la 11°C. Legăturile duble situate între atomii de carbon C-9 și C-10 respectiv C-12 și C-13 au o configurație cis. Prin oxidare cu $KMnO_4$ se formează acidul stavinic, numit și acidul tetrahidroxistearic, care se găsește în cantitate mare în semințe de struguri și în germeni de orez. Acidul linoleic s-a obținut și prin sinteză, confirmându-se structura sa de acid 9,12-dicis-octadecandioic. Întrucât are confirmație cis este ușor oxidat sub acțiunea lipoxidazelor.

Acizii trietenici au formala generală CnH_2 -$_6$COOH. Din această grupă fac parte acidul linolenic, acidul γ-linolenic, acidul homolinolenic și acidul elaeostearic.

Acidul linolenic ($C_{18}H_{30}O_2$) este un acid trietenic care însoțește acidul linoleic în numeroase produse vegetale. Are formula prescurtată

Scanned with OKEN Scanner

C_{18} : 3(C-9, C-12, C-15), iar formula structurală: $CH_3—(CH_2)_2—CH=CH—CH_2—CH=CH—CH_2—CH=CH—(CH_2)_7—COOH$.

Acidul linolenic la temperatura de 20°C este lichid incolor, insolubil în apă, solubil în solvenți organici, inclusiv în alcool. Prezintă maxime de absorbție în UV la 175 și 195 nm, fierbe la 147—148°C. Se obține în stare solidă din soluție alcoolică la temperaturi mai joase. Se extrage în cantitate mai mare din uleiul de in și din grăsimile foliare a speciilor *Trifolium pratense, Lolium perene, Brasica napus, Hordeum vulgare* etc. Acidul linolenic este activ sub aspect chimic, dând cu ușurință reacții de reducere, oxidare, adiție și polimerizare. Prin reducere se transformă în acid stearic, iar prin oxidare, în funcție de poziția fragmentării catenei carbonice se formează din acesta acidul malonic, aldehida propionică, acidul azelainic etc. Adiționează cu ușurință halogeni (brom, iod, clor) dând compuși halogenați care servesc la stabilirea poziției dublelor legături. Are o configurație cis la toate cele trei duble legături. Se obține prin sinteză, folosind ca substanțe de bază compuși acetilenici (ENESCU, 1990), Dintre izomerii acidului linolenic mai important este acidul elaeostearic (C_{18} : 3(C-9, C-11, C-13) care se găsește în semințe de *Cucurbitaceae* și *Rozaceae*. Mai puțin răspândiți sunt acizii γ-linolenic (C_{18} : 3(C-3, C-6, C-9, C-12) și homolinolenic (C_{18} : 3(C-3, C-8, C-11, C-14).

Acidul γ-linolenic s-a obținut din uleiurile vegetale prin bromurarea amestecului de acizi grași, urmat de un proces de debromurare și esterificare. Acest acid se găsește în cantitate ceva mai mare în uleiurile de bumbac, mac, ciubotica cucului și in.

Acidul arahidonic ($C_{20}C_{28}O_2$) este un acid tetraetenic, cu duble legături la C—5, C—8, C—11 și C—14. Are formula prescurtată C_{20} : 4(C—5, C—8, C—11, C—14), iar formula structurală :

$$CH_3—(CH_2)_4—CH=CH—CH_2—CH=CH—CH_2—CH=CH—CH_2—CH=$$
$$= CH—(CH_2)_3—COOH.$$

Se găsește în cantitate mai mare în semințe de *Typha augusta*.

Acidul arahidonic este o substanță solidă, cristalină, cu punct de topire la 77°C. Este insolubil în apă, dar solubil în solvenți organici și în hidroxizi alcalini. Acidul arahidonic se găsește în cantitate mai mare în grăsimile animale, în special în fosfolipidele din glandele suprarenale ale bovinelor. Se obține și prin sinteză sub forma acidului tetra-cis-arahidonic. Prin tratare cu ozon se rup dublele legături și rezultă acizii capronic, succinic, acetic, malonic și glutaric.

6.3. METODE DE DOZARE, NECESITĂȚI ȘI ACTIVITATE

Metode fizico-chimice. Aceste metode constau în determinarea numărului și poziției dublelor legături prin reacții de reducere și de oxidare, în special cu ozonul. Frecvent se utilizează reacțiile de precipitare a compușilor cu bromul. Ulterior, acizii bromurați din amestec pot fi debromurați cu ajutorul zincului și alcoolului. Sărurile de zinc ale acizilor linoleic și linolenic se separă între ele pe baza solubilității diferite în etanol.

Scanned with OKEN Scanner

Acizii grași nesaturați reacționează cu aminele aromatice și formează în prezența fenolilor colorații violet, care trec în verde-măsliniu și în final devin cenușii. Sensibilitatea acestor reacții crește prin adăugarea apei oxigenate.

Pentru identificarea și dozarea acizilor grași esențiali se folosesc de asemenea metode spectrofotometrice în UV și IR, metode cromatografice (cromatografia în fază lichidă, în stare gazoasă și cu adsorbanți solizi) și colorimetrice.

Metode biologice. Acestea se folosesc pentru prevenirea și respectiv vindecarea stărilor carențiale la șobolani.

Acțiunea asupra creșterii la șobolan. Pe baza mai multor observații experimentale, s-a remarcat că șobolanii hrăniți fără grăsimi, dar cu vitamine liposolubile în hrană, prezentau afecțiuni la nivelul pielii, iar de la a treia lună fără acizi grași încetau să mai crească. Prin adăugarea în hrana șobolanilor zilnic a 10 picături de untură de porc, simptomele determinate de lipsa grăsimilor din hrană încetau.

Metode care urmăresc simptomele cutanate, care apar la șobolani în lipsa acizilor grași nesaturați și vindecarea acestora prin adăugarea vitaminelor F în hrană. În stările carențiale ale vitaminelor F se produce la șobolan o rărire și cădere a părului în partea posterioară a corpului. Pe piele și pe coadă apar pete, care ulterior se necrozează. Prin adăugarea grăsimilor în hrană, sau ungerea petelor cu acizi grași nesaturați, se produce vindecarea afecțiunilor cutanate.

Metode care urmăresc tulburările ciclului estral la șobolan în stări de hipovitaminoză E și vindecarea acestora prin adăugarea în hrană a acizilor nesaturați. Șobolanii sunt supuși unui regim alimentar lipsit de acizi grași esențiali, format din cazeină pură, zaharoză, drojdie uscată, săruri minerale și apă. Lotul martor primește pe lângă hrana lotului experimental și 10 picături de untură de porc pe zi. Normalizarea ciclului prin adăugarea de acizi grași esențiali servește ca reper pentru dozarea activității lor biologice.

La om, în stări de hipovitaminoză F, apar leziuni cutanate, cel mai frecvent sub formă de eczeme. La copii sub 2 ani se produce o scădere a indicelui de iod al lipidelor serice, fapt ce reflectă o scădere a conținutului acizilor grași nesaturați, fără să fi scăzut nivelul acidului arahidonic. Prin adăugarea slăninei în alimentație se produce vindecarea eczemelor cutanate, iar adăugarea în hrană a uleiurilor de floarea-soarelui, rămâne fără efect. Prin teste biochimice, prin determinarea spectrofotometrică a acizilor grași esențiali se produce o descreștere a acizilor grași totali cu 2 și 4 duble legături și o creștere a acizilor grași cu 3 duble legături la copii denutriți față de cei bine hrăniți.

Necesități. Administrarea a 50—60 mg/zi de acid linoleic la șobolani previne apariția simptomelor avitaminozei F. Acidul arahidonic s-a dovedit a fi de 3 până la 6 ori mai activ în testul de creștere, decât acidul linoleic. Ca aspecte particulare s-a observat că animalele tinere necesită cantități relative (kg corp) de 2—3 ori mai mari decât cele adulte, iar necesitățile masculilor sunt de 3—5 ori mai mari decât a femeilor, cu excepția perioadei de gestație. Necesitățile organismelor animale în acizi grași esențiali cresc proporțional cu creșterea în hrană, a conținutului acizilor grași saturați și a colesterolului.

Scanned with OKEN Scanner

Pentru vindecarea simptomelor de carență la șobolan, după unii autori, sunt necesare 20—60 mg acid linoleic pe zi, iar pentru prevenirea tulburărilor de creștere sunt necesare 20 mg. Doza optimă cu efect maxim a arahidonatului de metil este de 14 mg/zi. Necesitățile pentru o bună creștere a șobolanilor tineri sunt de 33 mg acid arahidonic sau 100 mg acid linoleic.

La omul adult necesitățile zilnice sunt aproximativ de 7—8 g acid linoleic, respectiv 100 mg/kg corp. La om carența în vitamina F apare în condiții deosebite, deoarece hrana conține acizi grași esențiali (uleiuri vegetale, grăsimi animale etc.) în cantități suficiente, iar rezervele proprii (500 g acid linoleic/70 kg) asigură o perioadă îndelungată aprovizionarea organismului cu AGE. În hipovitaminoze F experimentale, efectuate pe voluntari, s-a remarcat că după 3—6 luni de regim carențat scade conținutul AGE din sânge, iar valoarea indicelui de iod scade de la 123 la 93 și apar primele simptome carențiale. Hipovitaminozele F pot să apară la bolnavii hrăniți o perioadă îndelungată numai prin perfuzii, care sunt bogate în glucide solubile, aminoacizi și săruri minerale.

Copii sugari necesită un aport de 2—5 ori mai mare decât oamenii adulți. La copii în stări de hipovitaminoză F apar tulburări cutanante ca descuamarea pielii (eczemă infantilă), furunculoză, căderea părului, îngroșări exudative etc., care se vindecă prin adăugarea AGE în hrană. Vitaminele E se folosesc în cosmetică încorporate în diferite creme, loțiuni, unguente, pudre, fiind numite și „vitaminele cosmeticii".

Unități de activitate. Pentru aprecierea activității vitaminelor F se utilizează ca standard acidul linoleic, a cărui activitate este apreciată la 100 U/g. Acidul arahidonic are o activitate de 130 U/g, iar acidul linolenic de 9 U/g.

După unii autori, valoarea activității relative a acizilor linoleic, linolenic și arahidonic, în testul creșterii la șobolan, ar fi următoarea: acid arahidonic 100, acid linoleic 33 și acid linolenic 5,5. În felul acesta se poate aprecia că acidul arahidonic este de trei ori mai activ asupra creșteri șobolanilor decât acidul linoleic, iar acesta de șase ori mai activ decât acidul linolenic.

6.4. ABSORBȚIE ȘI TRANSPORT

Absorbția acizilor grași nesaturați și a celor esențiali se face în mod similar cu cea a grăsimilor și a celorlalte vitamine liposolubile. Esterii acizilor grași nesaturați din hrană ajung în intestin, suferă un început de proces de hidroliză sub acțiunea lipazei pancreatice. Pentru absorbția acestora este absolut necesară și bila și sărurile biliare care transportă acizii grași în complexe polienice hidrosolubile, care trec mai ușor prin mucoasa intestinală. După resorbția acizilor grași prin intestin, sărurile biliare revin în cavitatea intestinală și vor contribui la resorbția altor molecule de acizi grași. În procesul de resorbție intervin și reacțiile de fosforilare, cu formarea unor fosfatide de tipul lecitinei care trec mai ușor prin membrana intestinală. După absorbție, o parte din lipide ce conțin acizi grași nesaturați, trec prin vasele chilifere și prin canalul toracic în limfă, iar de aici la plămâni și ficat. O

Scanned with OKEN Scanner

altă parte din lipide, în special cele care conțin fosfolipide după absorbție ajung direct în sânge și de aici la ficat.

Pe cale experimentală s-a demonstrat că prin administrarea acidului linoleic în dietă crește simțitor conținutul acidului arahidonic din sânge și ficat. Prin folosirea de acetat marcat cu ^{14}C, în organismul șobolanilor acetatul se combină cu acidul linoleic, iar prin dehidrogenări succesive se formează în final acidul arahidonic, care se depozitează în cea mai mare parte în grăsimile de depozit ale animalelor. De asemenea, metil -^{14}C-linoleat, dat în hrana șobolanilor maturi, s-a găsit în grăsimea de depozit, sub formă de acid arahidonic marcat. Transformarea acidului linoleic, linolenic sau a altor precursori în acid arahidonic se face în cea mai mare parte în ficat, de unde va fi transportată la alte organe. Tot în ficat se formează în cea mai mare parte fosfolipidele de tip lecitină, formă sub care sunt transportați acizii grași prin sânge la organele de depozit. În ficat și în sânge o parte din acizii grași nesaturați se vor esterifica cu sterolii (mai ales cu colesterolul) și vor fi transportați sub formă de steride, pătrunzând în celulele diferitelor organe și în țesutul adipos. În grăsimile de depozit la om cantitatea de acid linoleic este mai mare decât a acidului arahidonic, fiind în raport de 9 la 1. La lecitinele provenite de la bovine raportul dintre conținutul acidului linoleic și a celui arahidonic este de 1,5 la 1.

Acizii grași esențiali din organism o parte se vor degrada pe cale β-oxidativă în acetil-CoA, iar o parte vor contribui la biosinteza prostaglandinelor.

Eliminarea acizilor grași esențiali se face prin fecale, bilă, glandele mamare, piele.

Biosinteza acizilor grași esențiali în plante se realizează din acizii grași saturați, printr-un proces de dehidrogenări succesive.

Ficatul reprezintă un depozit de mai lungă durată pentru AGE decât pentru acizii saturați sau acizii monoetenici. Dintre acizii grași esențiali, conținutul cel mai ridicat în ficat îl are acidul arahidonic. Cu ajutorul deuteriului s-a remarcat că majoritatea lipidelor trec din ficat în organele de depozit, de unde vor fi mobilizate pentru utilizări ulterioare. La nivelul ficatului are loc sinteza lipidelor proprii organismului respectiv. Acidul linolenic se găsește în cantitate foarte mică în organismul omului și al animalelor, iar acizii linoleic și arahidonic se găsesc în proporții diferite în diversele grăsimi ale organelor. Astfel, în lecitinele din ficatul de bovine, din totalul acizilor grași, acidul linoleic reprezintă 45% iar acidul arahidonic 31%. În glandele suprarenale, acidul arahidonic se găsește într-o proporție de 5,5%, iar în splină de 4%. La porc în grăsimile hepatice acidul arahidonic se găsește în proporție de 2—7% din total, iar în tiroidă de 0,4%.

Conținutul acizilor grași esențiali scade din organism în afecțiunile pielii și în perioada creșterii tumorilor.

6.5. RĂSPÂNDIRE ȘI NATURĂ

Acizii grași esențiali care intră în constituția vitaminelor F, se găsesc atât în organismele vegetale, cât și în produsele animale. În plante și în semințele acestora se găsește predominant acidul linoleic și acidul

Scanned with OKEN Scanner

linolenic, iar în organismele animale, predomină acidul arahidonic, care de fapt este sintetizat în cea mai mare parte în organismele animale din acizi polinesaturați, inclusiv din acizii linoleic și linolenic. În tabelul 6.1 se prezintă conținutul total al acizilor grași nesaturați din produse vegetale și animale, iar în tabelul 6.2 conținutul acizilor linoleic și linolenic din uleiuri vegetale și grăsimi animale.

Tabelul 6.1

Conținutul total al acizilor grași nesaturați din produse vegetale și animale, în g%

Produs	g%
Ulei din semințe de in	72 —83
Ulei de porumb	70
Ulei de orz încolțit	63
Ulei de soia	56 —63
Ulei de floarea-soarelui	52 —64
Ulei din germeni de grâu	44 —52
Ulei din semințe de bumbac	35 —50
Ulei de ovăz	31
Ulei de arahide	13 —27
Ulei de cocos	6 — 9,2
Ulei de măsline	4 —13,7
Untură de porc	5 —11
Seu de oaie	3 — 5
Margarină	2 — 5
Unt	1,9 — 4
Seu de vacă	1,1 — 4
Lapte uman	0,39— 0,40
Lapte de vacă	0,15— 0,23

Tabelul 6.2

Conținutul acizilor linoleic și linolenic din uleiuri vegetale și grăsimi animale, exprimat în procente, din totalul acizilor grași

Produs	Acid linoleic	Acid linolenic
A. **Uleiuri vegetale**		
Ulei din miez de nuci	68	3,1—15,8
Ulei din germeni de porumb	55	—
Ulei de floarea-soarelui	51,9	—
Ulei din boabe de soia	52	3,7
Ulei de secară	44,2	5
Ulei din semințe de in	43,8	30,1
Ulei de cânepă	41,6	22,8
Ulei din semințe de grâu	39,1	9,6
B. **Grăsimi animale**		
Grăsime de porc	16	—
Grăsime de oaie	5,8	—
Grăsime de bovine	5—6	16
Măduvă de bou	2,5	—
Ulei de ton, heringi	2	—
Seu	1,1—1,5	—
Unt	0—6	1,9—4
Lapte de vacă	—	0,15
Lapte matern	—	0,39—0,40

Scanned with OKEN Scanner

Acizii linoleic și linolenic din organismul omului și al animalelor provin în totalitate din hrană, în special din produsele de origine vegetală. Ei pătrund în organism sub formă de trigliceride care sunt hidrolizate în procesul de absorbție.

În organismele animale acizii linoleic și linolenic se găsesc mai ales sub formă de fosfolipide și steride și mai puțin sub formă de lipide neutre. Acidul arahidonic se găsește predominant în produsele de origine animală. Conținutul acestui acid, în g%, este de 13—14 în sardele, 10 în balenă, 6,1 în broasca țestoasă, 2,4 la capră, 0,30 la om. Acidul arahidonic se găsește la animale în structura unor fosfolipide, steride și chiar trigliceride.

Trebuie acordată o atenție sporită păstrării lipidelor care conțin acizi grași esențiali, deoarece aceștia se distrug foarte repede sub acțiunea oxidanților, a luminii, peroxidazelor etc., suferind repede procesul de râncezire.

Margarina și alte produse alimentare care provin prin hidrogenarea acizilor grași nesaturați, au un conținut foarte redus de acizi grași esențiali. Aceste produse au avantajul de a nu râncezi, de a nu primi gust și miros neplăcut, dar valoarea lor vitaminică este aproape inexistentă.

Din datele prezentate în tabelul 6.2. reiese în mod convingător, predominarea conținutului acizilor linoleic și linolenic în uleiurile vegetale, în comparație cu grăsimile animale. Acidul arahidonic este slab răspândit în organismele vegetale, având un conținut mai mare în semințele plantelor din genurile *Typha* și *Parinarium*.

În lipidele extrase din frunzele diferitelor plante superioare s-au identificat în mod frecvent acizii lauric, miristic, palmitic, stearic, arahic și behenic, dintre cei saturați, iar dintre cei nesaturați acizii palmitic (C-9-cis), hexadecantrioic (C-7, C-10, C-13), oleic, linoleic și linolenic. În majoritatea frunzelor predomină acidul linolenic ($C_{18}:3$), cu o reprezentare procentuală de 60—70% din totalul acizilor. Ca aspect caracteristic se remarcă prezența acidului 3-trans-palmitoleic ($C_{16}:1$) și a acidului hexadecantrioic, cu trei duble legături (C-7, C-10, C-13), toate cu configurația cis. Acesta se găsește în proporție de 11—17% în uleiul de rapiță și 30% în spanac.

Conținutul acizilor grași în lipidele foliare ale unor plante furajere se prezintă în tabelul 6.3.

Tabelul 6.3

Compoziția acizilor grași din lipidele foliare ale unor plante furajere, în % s.u. notați prin simbol

Specia	Acizi grași saturați			Acizi grași nesaturați			
	14:0	16:0	18:0	16:1	18:1	18:2	18:3
Brasica napus	—	15,5	—	—	—	—	67—71
Cloroplaste de grâu	urme	21,0	1,1	1,5	3,1	6,8	65,7
Dactylis glomerata	1,4	11,2	2,6	6,4	—	76,5	5,1
Hordeum vulgare	1,3	13,4	1,0	1,6	1,1	9,4	71,1
Ierburi de pășune	1,1	15,9	2,0	2,5	3,4	13,2	61,3
Lolium perene	0,2	11,9	1,0	1,7	2,2	14,6	68,3
Trifolium pratense	2,2	14,5	3,7	urme	—	5,6	72,3
Trifolium repens	1,1	6,5	0,5	2,5	6,6	18,5	60,7
Trifolium durum	urme	21,0	1,1	1,5	3,1	6,8	67,7

Scanned with OKEN Scanner

Schimbări în ceea ce privește proporția acizilor grași sub influența luminii s-au observat la plantulele verzi și la cele etiolate de porumb. Astfel, în frunzele etiolate acidul linoleic are o reprezentare procentuală de 27,3%. În frunzele verzi, raportul se schimbă în favoarea acidului linolenic, care reprezintă 69,0% din totalul acizilor, pe când conținutul acidului linoleic este doar de 7%. Lumina este un factor mai important decât vârsta plantelor, în influențarea compoziției lipidelor foliare, a naturii și a conținutului acizilor grași.

6.6. ROL ȘI ACTIVITATE BIOLOGICĂ

Acizii grași polinesaturați sunt prezenți în majoritatea celulelor contribuind la biosinteza lipidelor nesaturate în special a fosfolipidelor și a steridelor. Acțiunea lor este mai eficientă în prezența unor „covitamine", în special a vitaminelor E, K, B_1 etc.

Vitamina F este un factor de creștere. Ea are un rol însemnat în prevenirea unor dermatoze, a bolilor cardiovasculare, hepatice, inclusiv în prevenirea bolii canceroase. Vitamina F intervine în metabolismul colesterolului. În stările carențiale ale acestor vitamine colesterolul se depune pe pereții interiori ai vaselor sanguine în ficat, vezica biliară și tegumente, cu repercursiuni negative asupra sănătății oamenilor. Este dereglată de asemenea funcționarea normală a ficatului.

Vitamina F ajută la menținerea permeabilității normale a membranelor celulare. În stări carențiale, permeabilitatea multor celule devine anormală, permițând trecerea unor microorganisme patogene prin membrane, în special la nivelul tubului digestiv, inclusiv a microorganismelor intestinale.

Vitamina F are un rol esențial asupra sănătății și frumuseții pielii, căreia îi favorizează prospețimea, strălucirea și catifelarea având proprietăți antitoxice și tonifiante tisulare.

Acizii grași esențiali sunt componente ale fosfolipidelor și ale altor lipide care intră în structura membranelor celulare și ale formațiunilor subcelulare (mitocondrii, cloroplaste, ribozomi, reticul endoplasmatic etc.). Acizii grași esențiali din membranele mitocondriale activează grupările metilice și intervin în oxidoreducerile celulare. Grăsimile cu conținut ridicat în AGE scad nivelul colesterolului, prin formarea de steride și eliminarea acestora prin bilă.

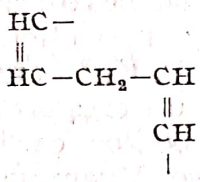
Pe cale experimentală s-a dovedit că acidul arahidonic poate fi transformat în prostaglandine (PGE_2) de către homogenate de vezicule seminale de berbec. Ulterior s-a dovedit că și precursorii acidului arahidonic (acidul homo-γ-linolenic (C-8, C-11, C-14) și acidul cis-eicosapentaenoic (C-5, C-8, C-11, C-14, C-17) pot forma diferite tipuri de prostaglandine. Din 1960 s-a stabilit cu certitudine rolul acizilor grași polinesaturați de precursori ai prostaglandinelor (HOWTEN și colab., 1976), reușindu-se să se determine și mecanismele de transformare a vitaminelor F în prostaglandine. S-a remarcat că acidul arahidonic accelerează agregarea trombocitelor umane „in vitro" și a iepurelui „in vivo", iar acizii homo-γ-linolenic și cel linolenic au un efect antitrombotic.

Scanned with OKEN Scanner

Metaboliții care rezultă din degradarea acidului arahidonic pe calea lipoxigenazei, au rol bronhoconstrictor, manifestând intoleranță față de analgetice, aspirină, antiinflamatorii, nesteroide etc.

Cercetările efectuate asupra acizilor grași esențiali au stabilit că în cazul acizilor linoleic și linolenic activitatea specifică a acestora este determinată de prezența dublelor legături dintre atomii C-9 — C-10 și C-12 — C-13. Gruparea carboxil nu influențează semnificativ activitatea acestor acizi. Esterificarea grupării carboxilice sau reducerea sa la grupare alcoolică nu duce la o modificare ușor perceptaibilă a acțiunii.

După unii autori, acizii grași esențiali sunt implicați și în activități enzimatice, fiind substraturi specifice ale lipoxidazelor, care determină degradarea oxidativă a acizilor grași nesaturați, în special a izomerilor cu configurație cis. Următoarea configurație a catenei carbonice a acizilor grași este necesară activității lipoxidazelor.



Nu toți acizii grași esențiali au o acțiune comună identică. Astfel, acidul linolenic influențează creșterea, dar nu are acțiune remarcabilă asupra afecțiunilor cutanante. Acizii linoleic și arahidonic influențează atât creșterea cât și vindecarea afecțiunilor pielii.

O unitate de acizi grași esențiali este egală după unii autori cu acțiunea a 10 mg de acid linoleic, în condiții standard.

6.7. HIPOVITAMINOZE ȘI HIPERVITAMINOZE

Șobolanii supuși unui regim alimentar carențat în acizi grași esențiali, după 8—10 săptămâni apar simptomele hipovitaminozei F, care se manifestă la început prin stagnarea creșterii, apariția dermatitelor și creșterea permeabilității pielii. În faza ulterioară se agravează eczemele descuamative, apar pete roșii pe labe și coadă, căderea părului, necrozarea petelor roșii-violacee, căderea cozii. După trei luni de la instalarea avitaminozei apar afecțiuni la aparatul genital, cu scăderea capacității de reproducere. La masculi se produce atrofia testiculelor cu degenerarea celulelor germinative, iar la femele apar dereglări ale ciclului estral și a ovulației, prelungirea timpului de graviditate, nașterea puilor morți și lactație deficitară (BEDELEANU, 1985). Apar de asemenea tulburări ale tubului digestiv, cu afectarea absorbției lipidelor și a vitaminelor liposolubile. Crește fragilitatea capilarelor, alterarea cartilajelor de conjugare, hematurie, afecțiuni hepatice și renale, care pot cauza moartea animalelor.

Prin aplicarea acizilor grași esențiali la nivelul pielii se produce vindecarea afecțiunilor dermatidice, fapt ce confirmă rolul esențial pe care îl au AGE în metabolismul tisular al tegumentului. În general, se remarcă o scădere bruscă a conținutului AGE din sânge odată cu apariția afecțiunilor tegumentare.

Scanned with OKEN Scanner

Lipsa din hrană a AGE determină grave tulburări de absorbție a grăsimilor și a celorlalte vitamine liposolubile, apar afecțiuni hepatice, inclusiv ciroză, iar copiii nou născuți au o creștere mult încetinită și crește procentul celor decedați imediat după naștere. Apare anemia macrocitară, iar la sugari anemia hemolitică. În hipovitaminoza F apar dereglări la nivelul mitocondriilor (care conțin 20—30% acizi grași esențiali), cu scăderea eficienței oxidării fosforolitice și a enzimelor de oxidoreducere.

Nu s-au semnalat cazuri de hipervitaminoză F la om și animale în condiții normale de hrană, chiar îmbogățită cu acizi grași esențiali. Simptomele hipervitaminozei experimentale sunt analoage cu a hipovitaminozelor mai accentuate.

6.8. CORELAȚII CU ALTE VITAMINE, CU ENZIME ȘI HORMONI

Experimental s-a demonstrat că dermatita experimentală produsă la șobolan, determinată de un regim sintetic format din cazeină pură, zaharoză, săruri minerale, β-caroten, vitamine D, E, B_1, B_{12} și colină, poate fi vindecată complet numai prin administrarea concomitentă a piridoxinei cu a acidului pantotenic și a acidului linoleic. Între acțiunea acizilor grași esențiali și cea a piridoxinei există efecte convergente, de potențare a activității lor biologice. Dacă acidul linoleic se adaugă în doze mari, el poate vindeca singur afecțiunile dermatice, dar dacă se aplică în doze mici, devine eficient numai împreună cu piridoxina.

Vitamina B_1 intervine în raportul dintre acizii grași saturați și cei nesaturați. În stări carențiale de vitamina F, grăsimile nu se sintetizează în lipsa vitaminei B_1. Cele cu indice de iod mic se consumă, iar grăsimile cu indice de iod ridicat nu-și modifică conținutul. Administrarea de vitamina B_1 la șobolanii carențați face să scadă conținutul grăsimilor cu indice de iod ridicat și să crească biosinteza lipidelor cu indice de iod scăzut.

Acidul pantotenic stimulează biosinteza AGE. Se menționează corelații între conținutul AGE din sânge și geneza ficatului „gras", precum și prelungirea timpului de coagulare a sângelui. Grăsimile cu conținut ridicat în acizi grași esențiali scad în mod simțitor nivelul colesterolemiei, atât prin reacția de esterificare cu sterolii, cât și prin eliminarea sterolilor prin bilă.

În ce privește relațiile de reciprocitate dintre AGE și vitaminele B_1, B_6, se remarcă observația că la o dietă cu 5% acid linoleic se observă o creștere a eliminării vitaminei B_1 prin urină, probabil datorită unei biosinteze intestinale accentuate. Acizii grași esențiali stimulează dezvoltarea florei intestinale și implicit biosinteza vitaminelor din complexul B. Ei stimulează și procesele metabolice ale vitaminelor B, care nu depind de flora intestinală.

Vitaminele B_1, B_6 și acidul pantotenic intervin în menținerea raportului optim dintre acizii grași saturați și cei nesaturați, prevenind instalarea hipovitaminozei F. Vitamina B_1 stimulează transformarea glucidelor în lipide, mărind conținutul lipidelor ce conțin acizi grași saturați, iar vitamina B_6 stimulează transformarea unor aminoacizi în lipide. În mod normal, raportul dintre acizii polinesaturați și acizii sa-

Scanned with OKEN Scanner

turați la oameni este de 3 la 1. În ateroscleroză, concentrația acizilor polinesaturați scade foarte mult în raport cu acizii saturați.

Acizii grași esențiali funcționează în organism în corelație și cu vitaminele D, ușurând asimilarea calciului și fosforului în țesuturi. Ei stimulează transformarea carotenoidelor provitaminice în vitamine A.

Vitamina B_6, B_{12} și C, administrate șobolanilor în asociere cu acidul pantotenic, au efect curativ în stările de hipovitaminoză F. De asemenea α- și β-tocoferolul stimulează biosinteza și activitatea acizilor grași esențiali dacă au în hrană un conținut de 1 g la 0,5 mg pe zi. Ei au un rol profilactic în apariția eczemelor, în carență de vitamina F.

Datorită interrelațiilor dintre vitamine se realizează o folosire judicioasă a acestora în organism, putându-se substitui reciproc în stări carențiale sau în stări de stres.

Acizii grași esențiali, datorită ușurinței de a se oxida, intervin în activitatea unor sisteme enzimatice cum sunt lipoxidaza, catalaza, peroxidaza, citocromoxidaza etc.

Acizii grași esențiali sunt necesari pentru buna funcționare a glandelor endocrine, în special pentru glandele suprarenale și tiroidă. Ei interacționează cu adrenalina și noradrenalina, serotonina, cortizon și hidrocortizon, estrona, dietilstilbestrolul etc. Acizii grași esențiali asigură transportul oxigenului în procesele de respirație, formarea membranelor celulare împreună cu sterolii și substanțele proteice (ENESCU, 1990).

6.9. PREPARATE FARMACEUTICE

La om preparatele farmaceutice denumite „Vitamina F" sub formă de capsule conțin 270 mg și flacoane cu soluție ce conțin 10 ml esteri etilici ai AGE, care se extrag din uleiuri vegetale. Aceste preparate se folosesc la om în tratamente profilactice și mai ales curative, pentru eczeme, arsuri, psoriazis, seboree, acnee vulgară, furunculoză, ulcerații ale pielii, folosind pentru 2 capsule de 3 ori pe zi sau 50—150 picături de 3 ori pe zi, timp de 1—3 luni. Pentru copii dozele sunt mai mici, câte 10—20 picături pe zi, 1—4 luni, respectiv până la vindecarea totală.

Aceste preparate având o acțiune lipotropă se mai folosesc în hepatita cronică și degenerescența grasă a ficatului. Ele se folosesc și la prevenirea și tratarea diareei, a tulburărilor prostatice, a scăderii în greutate, a arteritelor, tromboflebitelor, calculi biliari etc.

În ateroscleroză și hipercolesterolemie se recomandă folosirea preparatului *Rowascleron,* care conține în capsulă esteri ai acizilor grași nesaturați din untura de pește, vitamina A 150 μg, clorhidrat de piridoxină 750 μg, anetol 18,75 mg, camfor 9 g, acid citric 5,625 mg, linoleat de metil 5,625 mg și mentol 36 mg. Pentru omul adult se indică utilizarea a 2 capsule de 3 ori pe zi. Pentru tratamentul pielii se folosesc unguente care conțin ulei de in nefiert, lanolină, butirat de cacao. Se mai folosesc și alte uleiuri vegetale bogate în acizi grași esențiali cum sunt uleiul din germeni de grâu, uleiul de soia, uleiul de floarea soarelui etc.

Scanned with OKEN Scanner

În cosmetică se folosește vitamina F pentru atenuarea și suprimarea ridurilor, de regenerare a prospețimii pielii și de prevenire a eczemelor, furunculozei, acneelor etc.

Preparatele farmaceutice care conțin AGE se folosesc pentru tratarea afecțiunilor dermatitice la diferite specii de animale (porc, iepure, bovine, câine, pisică), în special în tratarea plăgilor hemoragice, eczeme uscate, degenerarea testiculelor, leziuni renale și hepatice, necroze etc.

6.10. ANTIVITAMINE F

Nu se cunosc antivitamine propriu-zise sau substanțe care să inhibe activitatea acizilor grași esențiali. Cercetările în acest domeniu sunt reduse, iar rezultatele sunt puțin concludente. Dacă șobolanii sunt hrăniți cu o dietă în care în locul grăsimilor de porc conțin numai laurină, creșterea este redusă accentuat, fiind mai slabă decât în lipsa totală a lipidelor din hrană. Această acțiune se poate explica pe baza inhibiției competitive, întrucât există o asemănare structurală de substrat între AGE și laurină. Același fenomen se observă și prin utilizarea eloidinei în locul laurinei. Aceste tulburări metabolice nu pot fi explicate numai pe baza antagonismului structural, ci și prin schimbarea raportului dintre conținutul acizilor grași saturați și nesaturați din gliceride, fosfolipide, steride etc.

Scanned with OKEN Scanner

B. VITAMINE HIDROSOLUBILE

Vitaminele hidrosolubile sunt substanțe biologic active foarte diferite sub aspect structural. Ele au proprietatea fizică comună de a fi solubile în apă și insolubile în solvenți organici. Din această grupă fac parte „Complexul vitaminic B", vitamina C, vitaminele P etc.

Din complexul vitaminic B fac parte mai multe substanțe cu structură diferită, care au însă un rol fundamental asupra creșterii și dezvoltării organismelor, fiind într-o strânsă interfuncționalitate. Numeroase vitamine B îndeplinesc rolul de coenzime, participând activ la înfăptuirea metabolismului intermediar, luând parte la numeroase procese metabolice din organismele vegetale și animale. Vitaminele B se găsesc în general împreună, în aceleași produse vegetale, iar deficiența vitaminică B nu este în cele mai multe cazuri vindecată de o singură vitamină, ci de mai multe vitamine B, care au acțiune sinergică, fapt pentru care poartă numele de „complexul vitaminic B". Toate vitaminele B sunt necesare înmulțirii și funcționării normale a celulelor.

Din grupa sau complexul vitaminelor B fac parte vitaminele B_1, B_2, B_6, B_{12}, acidul pantotenic (vitamina B_5), nicotinamida (vitamina B_3), acidul paraaminobenzoic (vitamina B_8), acizii pteroilglutarici (vitamina B_9), biotina, mezoinozitolul, colina etc.

După rolul și activitatea lor biologică, vitaminele din complexul B se pot clasifica în:

— vitamine de creștere (vitaminele B_1 și B_2)
— vitamine dermatrope (vitamina PP pentru om, B_6 pentru șobolani, acidul pantotenic pentru păsări)
— factori de creștere a microorganismelor (biotina, acidul paraaminobenzoic)
— antianemice (vitamina B_{12}, acizii folici și folinici)

Activitatea biochimică a acestor vitamine se datorește în principal îndeplinirii rolului de coenzime, care participă la înfăptuirea unor procese biologice fundamentale pentru viața organismelor (respirație, biosinteză, metabolism energetic, înmagazinarea și transmiterea informației genetice etc.). În tabelul 1 B se prezintă vitaminele care îndeplinesc rolul de coenzime, enzimele și reacțiile catalizate de acestea.

Vitaminele din complexul B sunt biosintetizate de plante și de unele microorganisme. Omul și animalele își procură vitaminele B din hrană și prin microflora din țesutul digestiv, fapt ce confirmă dependența accentuată a organismelor animale față de mediul înconjurător.

Scanned with OKEN Scanner

Tabelul 1.B

Vitamine B cu rol de coenzime (după BEDELEANU, 1985)

Vitamina	Coenzima	Enzima şi/sau reacţiile catalizate
Tiamina (B_1)	TPP	Complexul piruvatdecarboxilază, complexul piruvatdehidrogenaza, complexul α-cetoglutaratdehidrogenază, transcetolaze etc.
Riboflavina (B_2)	FMN, FAD	Transfer de hidrogen sau de electroni *,oxidaze:* L-aminoacidoxidaze, aldehidoxidaze, xantinoxidaza, D-aminoacidoxidaze, *dehidrogenaze:* NADH-dehidrogenaze, NADPH-dehidrogenaze, acil-CoA-dehidrogenaze, succindehidrogenaza, glutamatreductaza
Piridoxina (B_6)	PALPO	Sinteza grupărilor NH_2, *decarboxilaze:* aminoaciddecarboxilaza Tir, His, Trip, 5-hidroxi-Trip, Glu etc., *tramsaminaze:* GOT GPT etc., *deshidrataze:* ale Ser, Tre, homo-Ser etc., *desulfhidraze:* ale Cis, homo-Cis, *liaze:* aldolaze ale Tre, Ser etc.
Nicotinamida (PP)	NAD, NADP	În transportul hidrogenului sau electronilor, oxidoreductaze, epimeraze, hidroxilaze
Biotina	Biocitina	Transferul grupărilor „C_1", Acetil-CoA-carboxilaza, β-metil-CoA-carboxilaza, propionil-CoA-carboxilaza, metil-malonil-CoA-carboxilaza, piruvat-carboxilaza
Pantotenat	HS-CoA	În activarea şi transferul grupărilor acil în metabolismul acizilor graşi, a unor cetoacizi, hidroxiacizi, steroli etc.
Lipoat	LS_2	În formarea şi transfreul grupărilor „C_1" metil, formil, metilen
Acizi folinici (B_9)	FH_4	
Cobamida (B_{12})	Deoxiadenozincobamide	În formarea şi transferul grupărilor alchil, metilaspartmutaza, metil-malonil-CoA-mutaza, dioldehidraze, metioninsintetaza, ribonucleotidreductaza

Un conţinut mai mare de vitamine B se găsesc în drojdii, boabele cerealelor şi a plantelor leguminoase, în diferite fructe şi legume, ciuperci, polen şi ficat.

Vitaminele din complexul B nu se depozitează în cantităţi mari în diferite organe şi ţesuturi, cu excepţia vitaminei B_{12} care se depozitează în ficat. Restul vitaminelor B se menţin în circulaţia sanguină la un conţinut necesar funcţiilor biologice pe care la îndeplinesc, excesele fiind eliminate prin urină. O raţie alimentară completă şi echilibrată în principii nutritive asigură din plin necesarul de vitamine B pentru îndeplinirea funcţiilor lor biologice la om şi la animale. Necesităţile în vitamine B cresc în cazuri de infecţii, consum sporit de glucide, stări de stres, sarcină, alăptare etc.

Vitaminele hidrosolubile se deosebesc de cele liposolubile sub mai multe aspecte. Excesul de vitamine hidrosolubile din celule şi lichidele biologice este uşor excretat prin urină, astfel încât cazurile de toxicitate sunt rare în comparaţie cu vitaminele liposolubile. În popor se spune că vitaminele hidrosolubile nu se depozitează în corp, ceea ce nu este tocmai corect deoarece şi aceste vitamine se depozitează în diferite ţesuturi şi organe, dar în cantităţi foarte mici. În timp ce vitaminele

Scanned with OKEN Scanner

liposolubile nu îndeplinesc rolul de coenzime, cele hidrosolubile iau parte în numeroase procese metabolice sub formă de coenzime cu rol însemnat atât în reacțiile de oxidoreducere, carboxilare și decarboxilare, hidrogenare-dehidrogenare, în reacții de transfer, cât și în hematopoieză. Deoarece vitaminele au un rol central în metabolismul energetic, în stările carențiale este afectată creșterea organismelor, cu dereglări ale sistemului nervos, sistemului muscular, cardiovascular, endocrin etc., afectând buna funcționare a unor organe (ficat, rinichi, tub digestiv, piele, inimă, glande endocrine etc.).

Pe baza a numeroase cercetări, efectuate în diferite țări, în secolele XVII și XIX s-a constatat că vitaminele B_1 și B_2 nu se găsesc în general singure, în diferite surse vegetale sau animale, ci asociate cu alte vitamine, dintre care unele și-au dezvăluit cu greu „înrudirea". Totodată s-a remarcat că unele vitamine din complexul B acționează în același sens, se completează și se influențează reciproc, că fac parte dintr-un „ansamblu" (complex) vitaminic, indispensabil metabolismului celular (nutriție, catabolism, anabolism). Unele vitamine din complexul B nu au eficiență maximă dacă se administrează singure în diferite tratamente, ci numai asociate cu alte vitamine cu acțiune sinergică. Fiecare vitamină B pare să îndeplinească rolul de catalizator și reglator pentru activitatea celorlalte vitamine B, cu acțiune sinergică. Vitaminele B se completează unele pe altele în diversele lor funcții, nu numai ele între ele, ci și cu alte vitamine (A, C, D etc.). Astfel, doze mari de vitamina B_1 administrate experimental o perioadă mai îndelungată, determină apariția pelagrei. Boala apare nu datorită lipsei din organism a vitaminei PP, ci datorită distrugerii acesteia, anihilării activității acesteia printr-un exces de vitamină B_1.

Lipsa din hrană a vitaminelor din complexul B se manifestă în moduri diferite, predominând stările de insomnie, nervozitate, depresiune nervoasă, albirea și căderea părului, tulburări cutanante și digestive, constipație, inapetență, anemii, modificări la nivelul limbii etc.

În majoritatea tratamentelor profilactice și curative, pentru prevenirea și vindecarea bolilor carențiale, este mai important să se administreze bolnavilor o hrană naturală bogată în crudități, în fructe și legume, cu conținut ridicat și variat în vitamine, decât să se administreze o singură vitamină sintetică, care administrată nepotrivit, poate să determine un dezechilibru vitaminic și hormonal.

Experimental s-a demonstrat că o alimentație sănătoasă, echilibrată în substanțe nutritive, asigură nevoile zilnice în vitamine ale organismului uman. Este convingător să amintim că 20 g de drojdie uscată conțin 10—20 mg vitamină PP, doza zilnică necesară pentru om, iar 2 g de pătrunjel proaspăt conțin aproximativ 20 mg vitamină C, aproximativ 25% din nevoile zilnice ale omului.

Scanned with OKEN Scanner

Capitolul 7. VITAMINA B_1

7.1. Scurt istoric 179
7.2. Structura moleculară 181
7.3. Proprietăţi fizice şi chimice 182
7.4. Metode de identificare şi dozare 186
7.5. Răspândire în natură 188
7.6. Biosinteză, absorbţie şi necesităţi 190
7.7. Rol şi activitate biologică 192
7.8. Hipovitaminoze şi hipervitaminoze 197
7.9. Toxicitate şi farmacologie 199
7.10. Interrelaţii cu alte vitamine şi hormoni 201
7.11. Analogi structurali şi antivitamine B_1 202
7.12. Preparate farmaceutice şi indicaţii terapeutice 205

Vitamina B_1 se mai numeşte *tiamină,* deoarece conţine sulf şi azot aminic în molecula sa, *aneurină* sau *antinevrită,* întrucât previne şi vindecă polinevrita aviară, *vitamină antiberiberi,* pentru că vindecă boala beri-beri.

Vitamina B_1 are un rol însemnat în metabolismul intermediar, în procesele de creştere şi dezvoltare, în procesele de biosinteză şi catabolism, în prevenirea şi tratarea unor afecţiuni digestive, hepatice, ale sistemului nervos, endocrin şi muscular etc., fiind totodată un factor de creştere pentru numeroase microorganisme. Se găseşte în cantitate mai mare în coaja boabelor de cereale, drojdie de bere, arahide, fructe şi legume, nuci etc.

7.1. SCURT ISTORIC

O mare parte din datele istorice privind descoperirea vitaminei B_1 s-au prezentat la capitolul introductiv (Capitolul 1), astfel încât nu le vom prezenta integral în continuare. Simptomele afecţiunilor care apar în stări de avitaminoză B se cunosc din timpuri foarte îndepărtate, de peste 2500 ani, fiind denumite sub numele generic de boala beri-beri. O parte din aceste afecţiuni s-au prezentat în 1624 de către *J. de Bondt,* în lucrarea *„De Medicina Indorum“,* fiind completate şi republicate ul-

terior de *J. C. Malcolmson* în 1835. În perioada 1878—1883 aproximativ o treime din marinarii japonezi se îmbolnăveau anual de boala beri-beri, fapt ce l-a determinat pe generalul Takaki, pe baza unor cercetări experimentale, să recomande îmbunătățirea hranei marinarilor cu proteine, legume și fructe proaspete și să înlocuiască din rație orezul decorticat cu orez cu coajă, nedecorticat.

O cercetare mai sistematică și mai completă asupra cauzelor care determină apariția bolii beri-beri a efectuat-o în 1895—1897 renumitul cercetător *Ch. Eijkman*, care locuia în Jawa — Indonezia. Fiind cooptat într-o misiune sanitară subvenționată de guvernul olandez pentru descoperirea eventualilor agenți patogeni, presupuși că determină apariția bolii beri-beri, care provoca numeroase îmbolnăviri în rândul soldaților din Indiile olandeze, a remarcat că găinile hrănite cu orez decorticat se îmbolnăveau de polinevrită, cu simptome similare celor care apar la oamenii bolnavi de beri-beri, iar păsările (găinile) hrănite cu orez nedecorticat nu se îmbolnăveau. Dacă în hrana găinilor bolnave se adăugau coji de orez sau extract apos din cojile de orez, boala se vindeca în mod treptat. Era evident că în coaja boabelor de orez, există „ceva", a cărui absență din hrană determină apariția bolii beri-beri. *Ch. Eijkman* are meritul de-a arăta că boala beri-beri nu se datorește unui agent patogen (virus, bacterie, insecte etc.), ci unei „substanțe" care se găsește în cojile de orez. Observații similare a făcut în 1901 și *G. Grijns* (compatriot cu *Ch. Eijkman*) care a cercetat hrana deținuților din mai multe închisori din insula Jawa, descoperind polinevrita la oameni. Și el ajunge la concluzia că boala beri-beri se datorește unei substanțe care lipsește din bobul de orez decorticat, dar care se găsește în orezul normal nedecorticat. În 1911 *Cazimir Funk* izolează din cojile de orez un preparat cristalin, incolor și aciform, cu punct de topire în jur de 233°C, care administrat porumbeilor bolnavi de polinevrită, în doze de 0,02 g pe zi, determină o însănătoșire totală a acestora. Întrucât preparatul obținut de *C. Funk* conținea pe lângă C, H, O și N aminic, i-a dat numele de *vitamină* adică *amină vitală* sau *amina vieții*, cu toate că acest preparat nu era o substanță pură, ci un amestec de vitamine B, dintre care ulterior s-a stabilit că vitamina B_1 avea conținutul cel mai ridicat, apoi urma vitamina PP, acidul pantotenic, biotina etc.

În 1912 japonezii *Suzuki* și *Shamira*, au extras din cojile de orez „orizamina", care administrată în hrană, vindecă boala beri-beri, atât la om, cât și la păsări. În stare pură, sub numele de aneurină, vitamina B_1 s-a obținut în 1926 de către *B. C. Jansen* și *W. F. Donath*, iar structura moleculară s-a determinat în perioada 1931—1935 de către *R. R. Williams*, *A. T. Clarke* și colab. etc. S-a obținut prin sinteză de *R. R. Williams* în 1934—1935 și de către *H. Andersang* în 1936 (BEDELEANU, 1985).

În Indochina, în jurul anului 1950 s-au produs numeroase îmbolnăviri de beri-beri în rândul băștinașilor datorită înlocuirii din hrană a orezului obișnuit cu cel decorticat. Tratamentul efectuat de Serviciul francez al sănătății a constat din administrarea în hrană bolnavilor de „paddy" (orez nedecorticat), iar la cazurile mai grave s-a administrat vitamina B_1, care are un efect important asupra sistemului nervos și a tubului digestiv.

Scanned with OKEN Scanner

7.2. STRUCTURA MOLECULARĂ

Vitamina B_1 are formula generală $C_{12}H_{17}ON_4S$, iar formula structurală se prezintă în figura 7.1.

Vitamina B_1, 3-(4-amino-2-metil-pirimidil-5-metilen)-5'-(β-hidroxietil)-4'-metiltiazol, este formată dintr-un nucleu pirimidinic (A) și unul tiazolic (B), unite printr-o punte metenilică ($-CH_2-$) care se leagă de atomul C-5 din nucleul pirimidinic și de atomul de azot (N-3') din nucleul tiazolic. Pe nucleul pirimidinic se găsește un radical metil la C-2 și o grupare aminică la C-4, iar pe nucleul tiazolic se găsește un radical metil la C-4' și o grupare hidroxietil la C-5'. Vitamina B_1 este deci un derivat de pirimidină și de tiazol conținând în moleculă două cicluri, un heterociclu hexagonal cu doi atomi de azot și un heterociclu pentagonal cu un atom de azot și unul de sulf. În comerț, vitamina B_1 se găsește sub formă de clorhidrat de tiamină ($C_{12}H_{18}ON_4SCl_2$), forma curentă sub care această vitamină se găsește în farmacii. Se extrage sub formă cristalină din cojile boabelor de orez și se obține și pe cale de sinteză. În ce privește relația dintre structură și activitate s-a constatat că prin înlocuirea radicalului metil de la C-2 cu $C_2H_5^-$ se obține un compus cu activitate biologică de două ori mai mare ca a vitaminei B_1, dar prin înlocuirea aceluiași metil cu un radical butil (C_4H_9-) se formează o antivitamină B_1. Prezența grupării $-NH_2$, fixată la C-4 este absolut necesară pentru activitatea acestei vitamine. Înlocuirea sa cu alte grupări duce la formarea de antivitamine. Puntea metilenică ($-CH_2-$) care unește cele două heterocicluri, are de asemenea un rol însemnat în activitatea biologică a tiaminei. Înlocuirea sa cu o punte etilenică ($-CH_2-CH_2-$) determină o scădere a activității vitaminice de 10 ori. În nucleul tiazolic, radicalul de la C-4' trebuie să aibă o catenă carbonică cât mai scurtă. Cel mai activ este radicalul metil, iar înlocuirea acestuia cu radicalii etil sau propil determină o scădere a activității vitaminice cu 50%. Radicalii cu catene carbonice mai mari de C_3 duc la pierderea activității vitaminice. Radicalul alcoolului etilic fixat la C-5' este foarte important pentru formarea de esteri fosforici și pirofosforici pentru a putea forma coenzimele active. Cel mai activ radical este cel al etanolului. Radicalul alcoolului propilic imprimă tiaminei o activitate biologică mai redusă. Atomul C-2' trebuie să conțină hidrogen. Substituirea hidrogenului cu $-CH_3$ sau $-C_2H_5$ determină inactivarea activității vitaminice. Dacă se substituie cu sulf, se obține o sulftiamină activă. Înlocuirea sulfului tiazolic din pentaciclu cu oxigen are ca efect pierderea activității vitaminice.

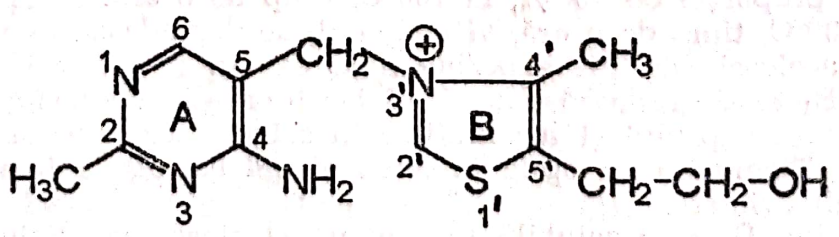
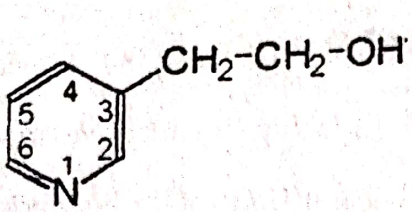
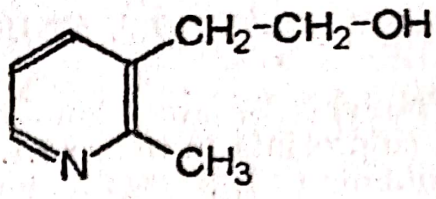


Fig. 7.1. Formula structurală a vitaminei B_1

Scanned with OKEN Scanner



3 - hidroxietilpiridina



2 - metil - 3 - hidroxietilpiridina

Fig. 7.2. Formulele structurale ale 3-oxietil-piridinei și 2-metil-3-oxietilpiridinei

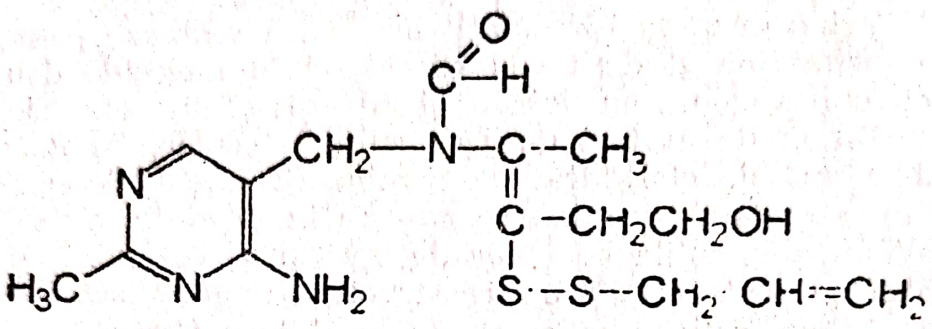


Fig. 7.3. Formula structurală a alliltiaminei

Dintre compușii activi, cu activitate biologică similară tiaminei, dar cu structură mai simplă fac parte 3-oxietil-piridina și 2-metil-3-oxietil-piridina (fig. 7.2). Alliltiamina (fig. 7.3) este de asemenea un compus cu acțiune vitaminică similară tiaminei, care având caracter liposolubil este mai stabilă în sânge și are o activitate cocarboxilică mai mare.

7.3. PROPRIETĂȚI FIZICE ȘI CHIMICE

Vitamina B_1 pură se prezintă sub formă de pulbere albă sau de cristale aciculare, incolore, care cristalizează cu o moleculă de apă. Vitamina B_1 cristalizează în sistem monochimic, are punctul de topire la 221°C, iar în soluție prezintă un punct izoelectric la pH 9,2. Este sensibilă la acțiunea luminii ultraviolete, în special la radiațiile cu lungimi de undă la 256 nm, care o inactivează rapid la pH 7. Rezistența la căldură este mult influențată de condițiile mediului în care se află. Pulberea cristalină uscată suporta o temperatură de 100°C timp de 24 de ore, fără să se degradeze. Sub formă de soluție apoasă, în special la un pH ridicat (10—12), vitamina B_1 se distruge chiar la temperatura obișnuită. În prezența sărurilor de borax, degradarea vitaminei B_1 se realizează în proporție de 100%, la 100°C, timp de o oră. În apă netamponată, la 100°C, timp de o oră, vitamina B_1 se degradează în proporție de 57%. În aceleași condiții experimentale dar în mediu acid de acetați, vitamina B_1 se degradează doar 10% iar în mediu de fosfați, în jur de 3%. Prezența cuprului și a sulfaților în soluție accentuează degradarea vitaminei. Tiamina este optic inactivă și se distruge sub acțiunea radiațiilor ultraviolete.

Vitamina B_1 este solubilă în acetonă și cloroform. Solubilitatea sa crește în mediu bazic. Tiamina are un miros caracteristic, pe care îl

imprimă drojdiei de bere. La temperatura obişnuită este destul de stabilă şi nu este oxidată de aerul atmosferic. În mediu bazic şi sub acţiunea oxidanţilor se descompune uşor.

Tiamina se comportă ca un electrolit amfoter, care formează cu acizii săruri cristalizate, ce pot fi folosite pentru dozări microchimice. Vitamina B_1 în soluţie are un caracter bazic, determinat de azotul cuaternar din nucleul tiazolic şi de gruparea aminică legată de C-4 a nucleului pirimidinic. Soluţiile acide ale tiaminei pot fi conservate fără să-şi piardă activitatea vitaminică în timp ce soluţiile neutre şi alcaline sunt instabile, mai ales prin încălzire şi în contact cu aerul. Sucul gastric care are pH acid nu are efect distrugător asupra tiaminei, sucurile alcaline (bila, sucul pancreatic, duodenul) descompun cu uşurinţă tiamina.

Clorhidratul de tiamină (fig. 7.4) se prezintă sub formă de cristale monoclinice grupate în rozetă. Este uşor solubil în apă (aproximativ 1 g/ml), glicerol, metanol şi etanol, dar insolubil în benzen, acetonă, eter, cloroform. În soluţii foarte diluate de acid clorhidric (0,001 N), prezintă un maxim de absorbţie caracteristic, la 247 nm. Clorhidratul de tiamină este stabil în stare uscată şi la întuneric, are gust amar şi se topeşte la 246—252°C, cu descompunere. Soluţiile apoase au pH acid. Clorhidratul de tiamină este incompatibil în tratarea cu oxidanţi, reducători, ioduri, borax etc. Formează precipitate cu iodul, acidul tanic, citratul de fier amoniacal, fenobarbital sodic, sulfamide sodice etc. Este incompatibil şi cu unii alcaloizi, alcooli, penicilină, ionii de cupru etc. Prin oxidare lentă cu $K_3[Fe(CN)_6]$, MnO_2 sau cu $KMnO_4$ în mediu bazic, se obţine reversibil tiocromul, în lumină ultravioletă. Intensitatea fluorescenţei este direct proporţională cu conţinutul tiocromului, fapt pentru care această reacţie se foloseşte pentru dozarea cantitativă a tiaminei. Tiocromul nu are activitate vitaminică, iar azotul din nucleul tiazolic are valenţa 3 şi nu 5 ca şi la tiamină. Transformarea tiaminei în tiocrom, prin intermediul unui compus dihidroxilic nestabil se prezintă în figura 7.5.

Tiocromul se formează prin dehidrogenarea tiaminei. El conţine cu doi atomi de hidrogen mai puţini decât tiamina. Transformarea biologică a tiaminei în tiocrom se face sub acţiunea tiamindehidrogenazei care s-a identificat în sânge, tiroidă, hipofiză. Sub acţiunea tiaminazei, vitamina B_1 se scindează în două componente. Aceeaşi reacţie de rupere a moleculei se produce şi sub acţiunea sulfitului de sodiu, cu apariţia grupării sulfonice $-CH_3-SO_3H$ în locul grupării hidroxilice CH_3-OH.

Prin tratarea tiaminei cu oxidanţi mai tari (HNO_3, $KMnO_4$) se obţin produşi de degradare mai avansaţi, fără activitate vitaminică. În gene-

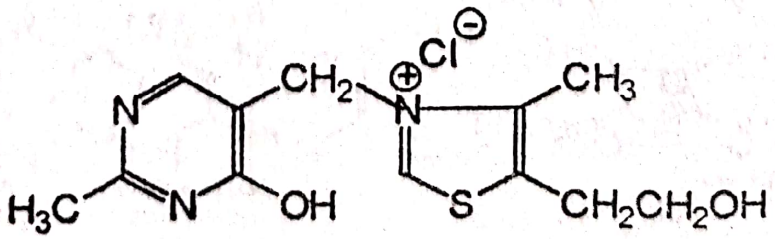


Fig. 7.4. Formula structurală a clorhidratului de tiamină

Scanned with OKEN Scanner

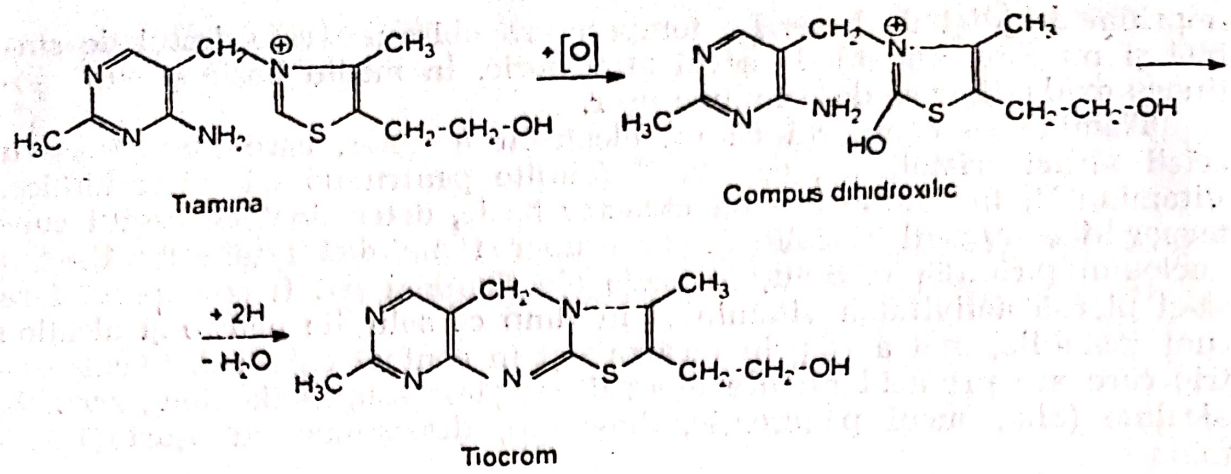


Fig. 7.5. Transformarea taiminei în tiocrom prin intermediul unui compus dihidroxilic nestabil

ral, toți produșii care rezultă din scindarea moleculei de tiamină, nu au activitate tiaminică, iar reacțiile sunt ireversibile.

Transformările chimice și cele enzimatice ale vitaminei B_1 se prezintă în figura 7.6.

În soluții alcaline, tiamina se transformă instantaneu într-un produs de culoare galbenă, cu o fluorescență albastră, care sub aspect chimic corespunde unui amestec de substanțe colorate, reunite sub numele de chinocrome.

În mediu alcalin, sub acțiunea iodului sau a apei oxigenate, tiamina se transformă într-un compus disulfidic (forma oxidată) care se reduce

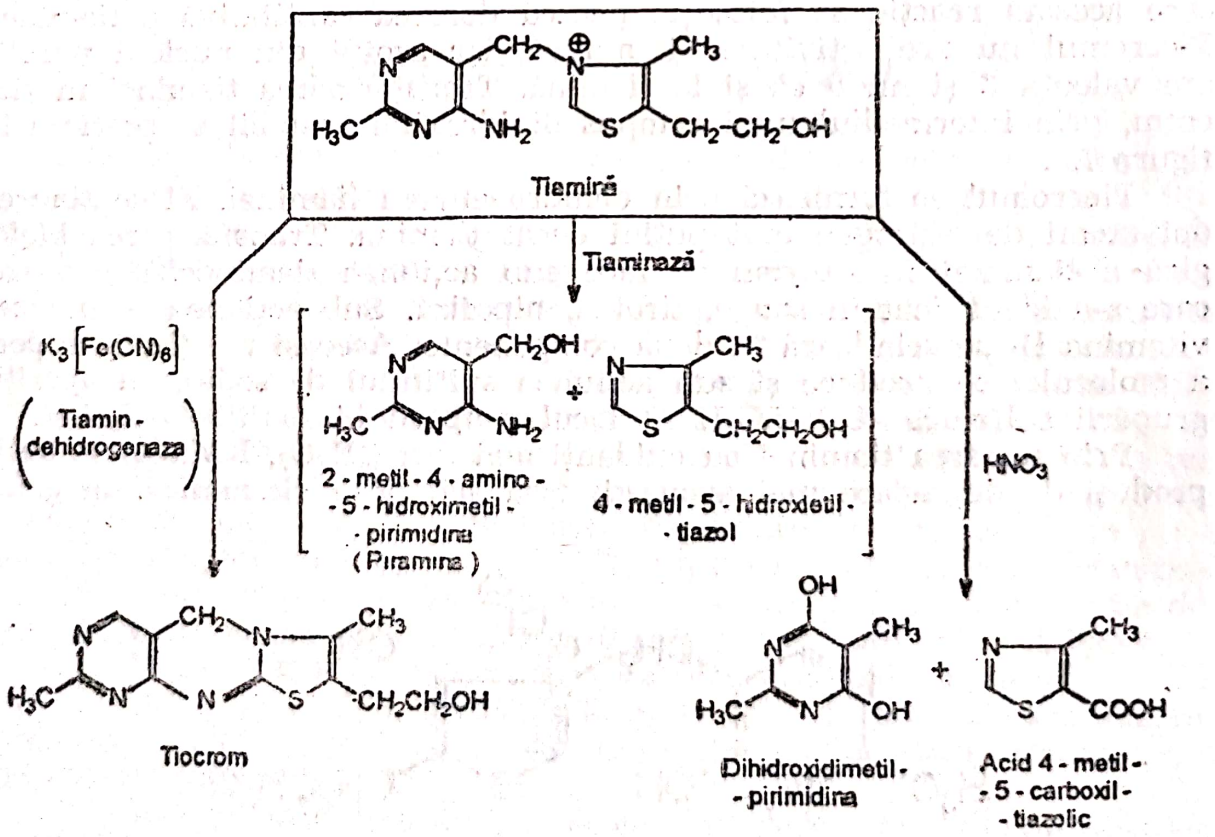


Fig. 7.6. Transformările chimice și enzimatice ale vitaminei B_1

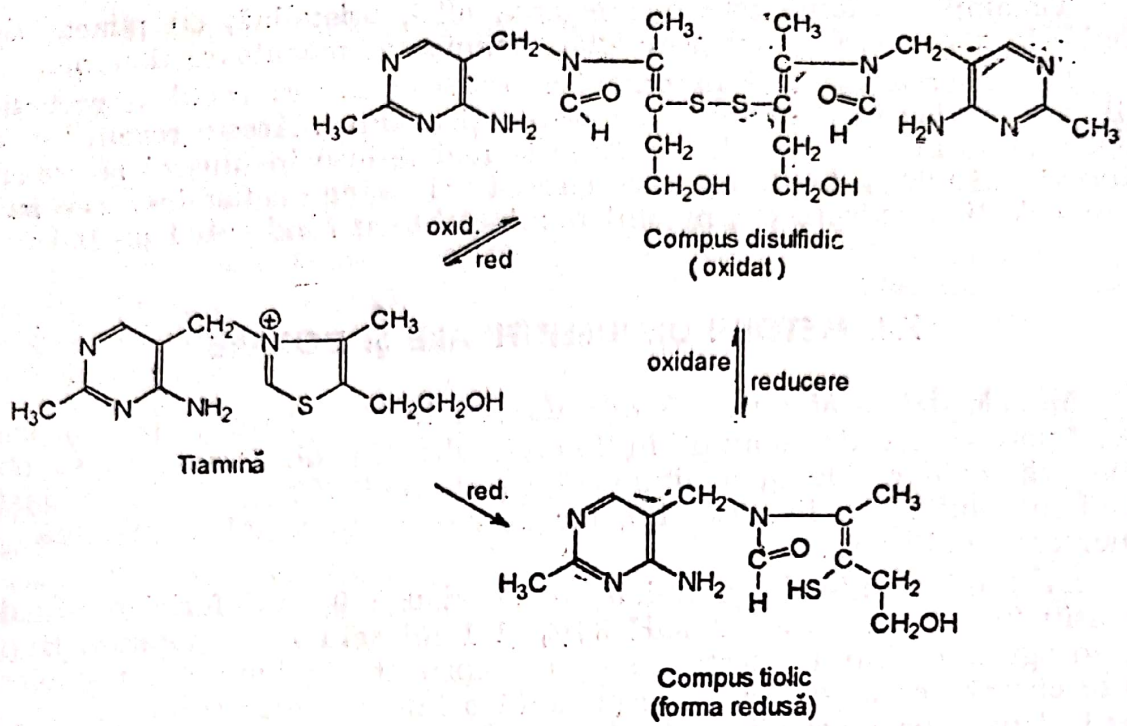


Fig. 7.7. Structura unui compus tiolic și a unuia disulfidie ce funcționează în celule ca un sistem redox

sub acțiunea hidrogenului sau a unor compuși tiolici (cisteina, glutation redus etc.) la un compus tiolic sau se reface tiamina. Se pare că acest compus tiolic cu -SH și compusul disulfidic cu legătură -S-S-, obținute pe cale biologică, funcționează în celule ca un sistem redox (fig. 7.7).

În organismele vegetale și în cele animale se realizează un echilibru între formele oxidate și cele reduse ale tiaminei și a esterilor fosforici ai acestora. Forma disulfidică este inactivă și devine activă numai printr-o reducere enzimatică.

Unul din derivații cei mai importanți ai tiaminei este esterul său pirofosforic numit tiaminpirofosfat (TPP), care îndeplinește rolul de coenzimă a decarboxilazei, numit și cocarboxilază (fig. 7.8).

Tiamina și tiaminpirofosfatul sunt distruse prin tratarea acestora cu sulfiți sau nitriți, fapt important folosit „in vitro" la prepararea mediilor complexe fără vitamina B_1, pentru dozări biologice. Tiamina se găsește în organism atât în stare liberă, cât și sub formă de TPP, care prin combinare cu proteine specifice câștigă proprietăți enzimatice. Ele se găsesc în organism și sub formă de complexe vitaminoproteice.

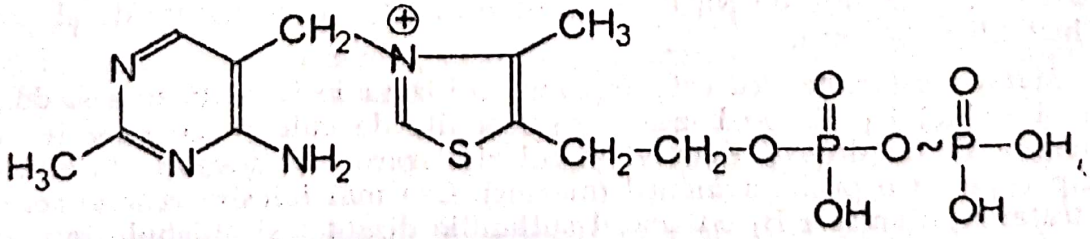


Fig. 7.8. Structura tiaminpirofosfatului (TPP)

Scanned with OKEN Scanner

Tiaminpirofosfatul este o substanță albă, cristalină, cu punct de topire la 242—244°C și cu proprietăți chimice asemănătoare tiaminei.

Fosforilarea tiaminei în organism este un proces rapid și reversibil care are loc în permanență în celule și țesuturi. Aceste reacții sunt mai intense în ficat, rinichi și sânge și mai reduse în mușchi și creier. Aproximativ 90% din forma care circulă prin sânge a tiaminei este sub formă de tiaminpirofosfat, nivelul tiaminei libere fiind sub 1 μg/100 ml.

7.4. METODE DE IDENTIFICARE ȘI DOZARE

Metode fizico-chimice. *Metoda fluorimetrică* se bazează pe măsurarea fluorescenței tiocromului în lumină ultravioletă. Tiocromul se obține prin oxidarea lentă a vitaminei B_1 cu $K_3[Fe(CN)_6]$ și alți oxidanți slabi în soluție alcalină (pH 10), iar în lumină ultravioletă prezintă o fluorescență albastră.

La 1 ml soluție de vitamina B_1 se adaugă 0,5 ml fericianură de potasiu 2%, 1 ml soluție NaOH 30% și 1 ml soluție de butanol. După ce se agită conținutul acestora se pune eprubeta în lumină ultravioletă și se observă că stratul alcoolic prezintă o intensă fluorescență albastră, care dispare prin acidulare și reapare la alcanizare. Adaptări ale acestei metode servesc pentru determinarea vitaminei B_1 din alimente sau din produse biologice. În aceste cazuri se impune eliminarea substanțelor fluorescente din produsele cercetate, prin adsorbție și eluție, folosind ca adsorbanți zeoliți, cărbune activ, schimbători de ioni etc.

Tiocromul format se extrage cu izobutanol și se fluorimetrează în comparație cu probe etalon de tiamină, sau față de soluții de chinină, care manifestă o fluorescență similară. Se poate proceda și la oxidarea vitaminei în produsele în care se găsește și apoi extragerea tiocromului cu izobutanol în care este ușor solubil și în fine, se realizează dozarea fluorimetrică. Pentru a evita perturbările care le pot produce unele substanțe din țesuturi și lichidele biologice, se procedează la adsorbția tiocromului pe diferiți schimbători de ioni (coloană de zeoliți). De pe adsorbanți tiocromul este eluat cu KCl în mediu slab acid. Eluatul de tiocrom se tratatează apoi cu $K_3[Fe(CN)_6]$, se adaugă izobutanol și hidroxid de sodiu. Soluția se agită și se centrifughează. Apoi se separă izobutanolul, care se usucă pe sulfat de sodiu anhidru și se fluorimetrează cu ajutorul unui fluorimetru fotoelectric, echipat cu filtru de 360 nm. În paralel se fluorimetrează și o soluție standard.

Metoda spectrofotometrică se bazează pe determinarea spectrului de absorbție a vitaminei B_1 care în lumină ultravioletă prezintă un maxim la 265 nm. În soluție de NaOH 4%, vitamina B_1 dă un maxim de absorbție instabil la 340 nm.

Metoda colorimetrică este frecvent utilizată la identificarea și dozarea vitaminei B_1. Ea se bazează pe reacțiile de culoare pe care le dă vitamina B_1 cu diferiți reactivi și colorimetrarea produsului obținut, în comparație cu o probă standard (martor). Cea mai folosită reacție constă în tratarea vitaminei B_1 cu acidul sulfanilic diazotat și aldehida formică, iar colorimetrarea produsului colorat în roșu obținut în urma reacției

Scanned with OKEN Scanner

se va face după 30—60 de minute, probele fiind ținute în acest timp la întuneric.

Reacții de culoare se obțin și prin tratarea vitaminei B_1 cu 2, 4-dicloranilină, paraaminoacetofenonă, paraaminobenzoat de etil etc. Produșii de culoare obținuți se extrag cu solvenți organici și se colorimetrează în paralel cu un standard tratat similar. Reacții de culoare dau în general toți compușii vitaminei B_1 cu sărurile de diazoniu.

Paraaminoacetofenona este frecvent utilizată pentru dozarea vitaminei B_1 din urină, sau din alte lichide biologice, obținându-se în urma reacției o culoare roșie. Produsul colorat se extrage ușor cu xilitol pentru colorimetrare.

În cazul dozării vitaminei B_1 din sânge sau alte lichide cu proteine se face la început deproteinizarea acestora cu enzime (proteaze, fosfataze acide etc.), iar serul și lichidele deproteinizate se trec apoi pe coloane adsorbante care conțin cărbune activ în amestec cu praf de celuloză, iar eluarea se face cu n-propanol. Prin tratarea vitaminei B_1 cu 2, 6-dibromochinonclorimidă, în soluție de borax la pH 9,6 se obține o culoare portocalie similară bicromatului de potasiu care servește ca standard la colorimetrare.

Meoda gravimetrică constă în formarea unui precipitat roșu-portocaliu prin reacția dintre vitamina B_1 și iodura dublă de bismut și potasiu (iodbismutat de potasiu).

Testele biologice se bazează pe stadiul comparativ al acțiunii antipolinevritice exercitate de unele substanțe naturale, față de efectul unor doze cunoscute de vitamina B_1. La porumbei, pui de găină, șobolani etc., aflați în stări carențiale de vitamină B_1 se mai folosesc curba creșterii în greutate, simptomele polinevritei, metoda bradicardiei șobolanului. La animalele în stare de avitaminoză B_1, inima are 250 bătăi pe minut, față de 500 în mod normal.

La plante se fac teste fitobiologice, care constau în determinarea creșterii rădăcinilor de mazăre *(Pisum sativum)*, care au o mare sensibilitate la acțiunea vitaminei B_1, chiar și la concentrații de 10^{-5} µg. Se fac de asemenea testări asupra creșterii și dezvoltării drojdiei de bere.

Testele microbiologice se bazează pe proprietatea vitaminei B_1 de a îndeplini rolul de factor de creștere pentru numeroase microorganisme, ca de exemplu: *Phycomyces blakesleanus, Escherichia coli, Leuconostoc mesentheroides, Lactobacilus fermenti, Neurospora crasa, Streptococcus salivari* etc. Cantitatea de vitamină B_1 necesară creșterii diferitelor microorganisme este acum cunoscută, fapt ce ne permite aprecierea aproximativă a concentrației microorganismelor în mediu de cultură.

Metodele biochimice se bazează pe dereglarea diferitelor procese metabolice, în stări de avitaminoză experimentală și vindecarea ulterioară a afecțiunilor apărute, prin administrarea unor doze de vitamina B_1. În acest sens se determină:

— consumul micșorat de oxigen în creierul porumbeilor aflați în hipovitaminoză și creșterea acestuia după adăugarea de vitamina B_1;
— aprecierea activității cocarboxilazei prin conținutul de CO_2 ce rezultă din decarboxilarea cetoacizilor;

Scanned with OKEN Scanner

— determinarea CO_2 format în procesul de fermentație alcoolică, după eliminarea cocarboxilazei din drojdia de bere și adăugarea de vitamină B_1;
— adăugarea de TPP la apocarboxilaza inactivă extrasă din drojdie și determinarea CO_2 produs din decarboxilarea substanțelor adăugate (cetoacizi, aminoacizi, hidroxiacizi etc.);
— determinarea transcetolazei din eritrocite, test de interes clinic. În carență tiaminică se produce un blocaj al transcetolazei, cu acumularea pentozofosfaților cu un conținut de trei ori mai mare decât la persoanele normale;
— determinarea raportului dintre acidul lactic și cel piruvic, diferit în stări de avitaminoză față de stările normale. În deficiență tiaminică are loc o acumulare de acid piruvic în sânge și o creștere a eliminării prin urină. Conținutul normal al acidului piruvic în sânge este în medie de 2,8 mg/100 ml;
— determinarea indicelui metabolismului glucidic, care are valori sub 15 pentru persoanele sănătoase și mai mari pentru persoanele aflate în stări carențiale de tiamină.

Acest test constă în determinarea conținutului de acid piruvic, acid lactic și glucoză, după administrarea unei cantități de glucoză (0,5—1,5 mg zilnic) și exercițiu muscular.

O Unitate Internațională (UI) este echivalentă cu 3,33 μg clorhidrat de toamină, iar 1 mg de vitamina B_1 este echivalent cu 333 UI. Conținutul TPP din eritrocite este de 7,5 μg/100 ml la omul sănătos. Valorile sub 3 μg/100 ml ale TPP-ului indică stări de carență. Tiamina se elimină prin urină la omul sănătos, zilnic în cantitate de 50—250 μg.

7.5. RĂSPÂNDIRE ÎN NATURĂ

Vitamina B_1 are o largă răspândire în natură fiind prezentă în toate organismele vegetale și animale. Ea se găsește de asemenea în toate alimentele de origine vegetală și animală, dar conținutul său este foarte diferit de la un produs la altul. Printre sursele naturale bogate în vitamina B_1 fac parte drojdia de bere, semințele cerealelor nedecorticate (orez, grâu, orz, porumb, ovăz etc.), ficatul, inima, rinichii, mușchiul de porc etc. Deosebit de bogate în vitamina B_1 sunt extractele apoase din drojdia de bere, drojdia alimentară, cojile cerealelor, unele ciuperci etc.

Conținutul vitaminei B_1 din plantele verzi variază între 2,5 și 10 μg/g. În siloz și fân cantitatea de vitamină este mult mai mică. În germenii de grâu și tărâțe de orez, vitamina B_1 are un conținut de 1,6—2,4 mg%, iar în produsele animale între 0,1—0,4 mg%. În drojdia de bere conținutul vitaminei B_1 variază între 5 și 25 mg/100 g, în germenii de orez între 2,8—3,5 mg/100 g, iar în extract de drojdie de 30 mg/100 g. Conținutul mediu al vitaminei B_1 în alimente de origine animală, exprimat în mg/100 g se prezintă astfel: 0,6 la carnea de vită, 0,1—0,2 la carnea de miel, 0,8—1 la carnea de porc, 0,1 la pasăre, 0,02 la lapte uman, 0,04 la lapte de vacă și de capră, 0,3—0,5 la gălbenușul de ou.

Scanned with OKEN Scanner

Conținutul vitamine B_1 din diferite produse alimentare vegetale se prezintă în tabelul 7.1. În sânge la oamenii adulți vitamina B_1 se găsește în cantitate mai mare în leucocite, cu un conținut de 7—15 μg%.

Fructele, produsele lactate și peștele sunt surse sărace în vitamina B_1. Importanța lor scade dacă se are în vedere că vitamina B_1 este hidrosolubilă și termolabilă, mai ales în mediu alcalin, fiind parțial distrusă în procesele culinare. Aportul adus de fructe, legume, lactate, produse din carne în vitamina B_1 este totuși foarte însemnat având în vedere masa mare din aceste produse care intră zilnic în consumul alimentar al oamenilor.

În bobul de cereale vitamina B_1 se acumulează în special în germen, coajă și endosperm. Pâinea albă este foarte săracă în vitamina B_1, deoarece aceasta se pierde în procesul de obținere a făinii albe, tratată cu oxidanți. Pâinea integrală și cea dietetică are un conținut cu mult mai mare de vitamina B_1 decât pâinea albă. În ultimii ani se practică îmbogățirea pe cale artificială a făinei de grâu și de porumb, a pâinii și a pastelor făinoase cu vitamina B_1 în vederea asigurării organismului cu minimul necesar de vitamină pentru buna funcționare a celulelor și a țesuturilor. În unele țări prin legislație s-a stabilit ca pâinea albă să conțină între 3,5 și 6 mg/kg de vitamina B_1.

În stabilirea dietei alimentare este necesar să se țină seama că prin fierberea alimentelor cu apă, aproximativ 30% din conținutul vitaminei B_1 trece în soluție, iar acest procent crește dacă se aruncă apa de la prima fiertură. Adăugarea de bicarbonat sau alte săruri alcaline mărește degradarea cantității de vitamină.

La prepararea conservelor în cutii și încălzirea acestora în autoclave la 120°C, pierderile se ridică până la 70—80%. Conservarea vegetalelor prin uscare cauzează pierderi relativ mici în vitamina B_1, până la 10—15%.

Tabelul 7.1

Conținutul vitaminei B_1 în diferite produse alimentare exprimat în mg/100 g

Produs	Conținut (mg/100 g)	Produs	Conținut (mg/100g)
Drojdie de bere	5 —25	Porumb boabe	0,15—0,20
Drojdie de panificație	1 —3	Mazăre	0,28—0,40
Extract de drojdii	30	Fasole uscată	0,16—0,48
Germeni de orez	2,8 —3,5	Fasole verde	0,35—0,40
Germeni de secară	1,5 —2,5	Morcovi	0,14—0,20
Germeni de grâu	1,2 —1,8	Mere	0,02—0,09
Germeni de porumb	1,0 —1,8	Pere	0,01—0,02
Tărâțe de grâu	0,5 —0,8	Caise	0,04—0,17
Orez — bob întreg	0,3 —0,4	Piersici	0,15—0,20
Secară	0,2 —0,4	Prune	0,06—0,15
Orz	0,4 —0,5	Struguri	0,06—0,1
Pâine integrală	0,3 —0,4	Lămâi	0,01—0,03
Pâine albă	0,1 —0,2	Portocale	0,06—0,09
Grâu boabe	0,4 —0,5	Cartofi	0,04—0,15
Făină de grâu	0,36—0,40	Conopidă	0,14—0,18
Ceapă verde	0,13—0,15	Spanac	0,07—0,09
Varză albă	0,05—0,25	Grapefruit	0,45—0,50
Tomate	0,05—0,16		

Scanned with OKEN Scanner

În unele cereale, legume și uleiuri se găsește un compus neenzimatic care scindează vitamina B_1 în cei doi compuși (tiazol și pirimidină), având o acțiune similară cu a sulfitului de sodiu. Acest compus este solubil în etanol 92°, rezistent la autoclavare și cauzează distrugerea în timp a vitaminei B_1 în diferite preparate, inclusiv în conserve. Se extrage cu un amestec de cloroform și apă. Colostrul este lipsit de vitamina B_1. S-a semnalat prezența unei enzime care distruge vitamina B_1 în carnea de pește crud, mai ales la peștii dulcicoli, în heringii din ocean etc. S-a constatat ca 100 g de carne de pește crud pot distruge 7,5 mg de vitamină B_1. Animalele hrănite cu pește crud un timp mai îndelungat, prezintă simptome de hipovitaminoză acută.

7.6. BIOSINTEZĂ, ABSORBȚIE ȘI NECESITĂȚI

Vitamina B_1 este biosintetizată de plante și unele microorganisme. Omul și animalele superioare își procură vitamina B_1 din hrană și prin intermediul florei intestinale. Vertebratele, ciupercile și unele microorganisme nu sunt capabile să-și procure prin biosinteză necesarul de vitamina B_1. Pentru aceste microorganisme vitamina B_1 constituie un important factor de creștere. Drojdiile sintetizează tiamina dacă în mediul de cultură se găsesc inelele structurale, cel tiazolic și pirimidina. O parte din plantele superioare și alge primesc tiamina de la microorganismele simbiotice. Tiamina influențează formarea rădăcinilor și creșterea plantelor, fiind considerată ca un „hormon vegetal". Prezența vitaminei B_1 în sol se datorește activității microbiene și secreției rădăcinilor plantelor. Plantele verzi, crescute la lumină, au un conținut mai mare de vitamina B_1 decât plantele etiolate.

Dintre organismele vertebrate, cele mai sensibile la carența de vitamina B_1 sunt păsările, în special porumbelul, primatele, găinile, omul, șobolanul, pisica, câinele, porcul și bovinele. Unele microorganisme din flora intestinală sunt producătoare (*Bacillus proteus, B. mesentericus, B. aerogenes, B. vulgatus, Escherichia coli* etc.), iar altele consumatoare de tiamină. În condiții de eubioză, conținutul tiaminei produs de flora intestinală depășește aportul exogen. În disbioză, datorită dereglării florei intestinale, conținutul tiaminei este cu mult mai mic și se poate instala hipovitaminoza tiaminică. Absorbția vitaminei B_1 se realizează la nivelul intestinului subțire, unde are loc într-o anumită proporție și pirofosforilarea acesteia cu formarea tiaminpirofosfatului (TPP). O absorbție normală necesită integritatea mucoasei intestinale și absența unor afecțiuni digestive. Inflamațiile și tulburările gastrice, în special anaclorhidria, influențează negativ resorbția tiaminei. Bila și sucul pancreatic, spre deosebire de sucul gastric, au efect negativ asupra absorbției și a stabilității vitaminei B_1.

Tiaminaza existentă în unele plante folosite în hrana cailor *(Equisetum sp., Pteridimium aquilium)*, determină degradarea tiaminei și provoacă avitaminoză la cai.

După resorbție intestinală, vitamina B_1 este transportată pe cale sanguină, sub formă liberă sau de TPP, care reprezintă forma activă a vitaminei B_1. Tiaminpirofosfatul rezultă prin fosforilarea tiaminei, cu ajutorul ATP-ului, sub acțiunea unei fosfokinaze, sau a unei fosfomu-

Scanned with OKEN Scanner

taze, când donatorul de grupare fosfat este acidul fosfogliceric sau acidul fosfopiruvic.

Tiamina atât sub formă liberă (10%), cât şi sub formă de TPP (90%) circulă în organism şi formează cu proteine specifice complexe proteice. Fosforilarea tiaminei în organism este un proces reversibl şi are loc permanent în celule şi ţesuturi. O activitate mai intensă de fosforilare a tiaminei se petrece în intestin, ficat şi rinichi şi mai redusă în muşchi şi creier. Fosforilarea tiaminei se produce în interiorul celulelor, unde are loc şi combinarea TPP cu proteina, cu formarea decarboxilazei. Vitamina B_1 în stare liberă se află predominant în lichidele biologice (plasmă, lichid cefalorahidian, umori etc.) dar datorită difuzibilităţii sale are loc un schimb liber permanent între vitamina B_1 din lichidele biologice şi cea din celule, iar sub formă de TPP în celule, ţesuturi, globulele sângelui.

În eritrocide se găsesc 20 $\mu g/10^{12}$ eritrocite şi 3 400 $\mu g/10^{12}$ leucocite (BEDELEANU, 1985). Sângele omului adult conţine 7—15 µg/100 ml de tiamină, dintre care 90% sub formă fosforilată (TPP), iar restul în stare liberă. Un conţinut sub 3—4 µg/100 ml indică o stare carenţială.

Transformarea tiaminei în TPP se realizează sub influenţa tiaminpirofosforilazei care transferă restul pirofosforic de pe ATP în tiamină. Această enzimă poate fi deficitară în boli hepatice (diabet), boli nervoase, cardiace, infecţioase etc.

La oamenii adulţi, tiamina se găseşte depozitată sub formă de TPP aproximativ 2,4 µg/g în ficat şi rinichi, iar 3,6 µg/g în muşchiul cardiac. Depozitarea tiaminei sub formă de TPP în diferite organe se face în cantităţi foarte mici şi de scurtă durată. Pentru utilizarea tiaminei depozitate, aceasta prin defosforilare se transformă în tiamină, în stare liberă, care este vehiculată prin sânge la diferite ţesuturi şi organe unde se va refosforila.

Transportul tiaminei libere şi a TPP-ului se face prin legarea acestora de enzime specifice (cocarboxilaze). Nu există un organ specific de depozitare a tiaminei, astfel că este necesar un aport permanent al acestei vitamine.

Vitamina B_1 se elimină în cea mai mare parte sub formă liberă, sub formă de TPP şi ca produşi de degradare pe cale renală, în proporţie de 61% din tiamina administrată cu ^{14}C. La om prin urină se elimină între 50—250 µg în 24 de ore. Valori mai mici de 40 µg indică o stare de avitaminoză. Pe cale experimentală s-a stabilit că din 1 mg de tiamină administrată oral se elimină prin urină 130 µg. Excreţia prin urină a vitaminei B_1 poate să ne dea indicaţii asupra stării de hipovitaminoză.

Timpul de înjumătăţire a „vieţii" tiaminei în diferite organisme este de 9,5—19,5 zile. Majoritatea produşilor săi de degradare se elimină prin urină. Dintre aceştia principalii produşi de excreţie sunt carbonatul de tiamină (tiamina acid carbonic) şi piramina (2,5-dimetil-4-aminopirimidina) împreună cu cantităţi mici de tiamină degradată. Dintre alţi compuşi existenţi în urină, proveniţi din metabolizarea tiaminei, sunt 4-metil-5-(2-hidroxietil)-tiazolul, 2-metil-4-amino-5-hidroximetil-pirimidina, 2-metil-4-amino-5-pirimidin-acid carbonic, 4-metil-5-acetoxitiazol, tiaminpirofosfat, 2-metil-4-amino-5-formilaminometil-pirimidină, tiamin monofosfat şi alţi 15 compuşi încă neidentificaţi (AMOS, 1970). Prin fecale tiamina se elimină în proporţie de aproximativ 11%. Este greu să

Scanned with OKEN Scanner

se stabilească o relație între cantitatea de tiamină ingerată și cea eliminată prin fecale, deoarece unele microorganisme din flora intestinală o produc, iar altele o consumă. Este posibil de asemenea ca o parte din vitamina B_1 din fecale să reprezinte cantitatea neabsorbită. O altă cale de eliminare a vitaminei B_1 este prin transpirație, care poate determina în transpirații excesive ,chiar și o stare de carență. Sportivii în activitate, elimină aproximativ 15—20 μg/24 de ore.

Necesitatea în vitamina B_1 a organismului uman este în funcție de vârstă, de condițiile de muncă, de alimentație și mai ales de consumul de glucide. La un consum de un gram de glucide solubile este necesar 1 μg de tiamină. În general se admite un necesar de vitamina B_1 de 1 mg (minim) până la 2,5—3 mg (optim) pe zi, ținând seama că la aportul exterior de vitamină se adaugă și cantitatea sintetizată de flora intestinală. În timpul sarcinii, în perioada alăptării și în unele afecțiuni, cantitatea de vitamină B_1 necesară organismului este mai mare. Cercetările experimentale efectuate pe voluntari arată că după un regim sărac în vitamina B_1, timp de 15 zile, apar semnele biochimice ale carenței. Cerințele în vitamina B_1 sunt mult mai mari într-un regim bogat în glucide și mai redus în cazul predominării lipidelor în hrană. Necesitățile crescute în vitamina B_1 apar și în tulburările de absorbție, atrofii și inflamații ale mucoaselor intestinale, colite ulcerative, în diabet, boli infecțioase, hipertiroidism, stări febrile etc. Experimental s-a demonstrat că deficitul de vitamina B_1 scade rezistența animalelor la infecții.

Doza de întreținere pentru porumbel este de 65—125 γ/zi, iar la puiul de găină de 170 γ/zi. La șobolan ținut în regim sărac în grăsimi nevoia zilnică pentru menținerea greutății este de 5 γ, pentru o creștere mediocră de 7—8 γ, iar pentru o creștere normală de 10 γ.

7.7. ROL ȘI ACTIVITATE BIOLOGICĂ

Vitamina B_1, în special sub forma esterului său pirofosforic, numit tiaminpirofosfat (TPP) sau cocarboxilază (fig. 7.8) are un rol fundamental în desfășurarea normală a unor procese metabolice de bază în organism.

Acțiunea biologică a vitaminei B_1, la fel ca și a altor vitamine din complexul B, se datorește în cea mai mare parte contribuției acestora la formarea unor enzime. Tiamina, sub forma de TPP, participă la biosinteza unor decarboxilaze, cu rol important în procesele de decarboxilare oxidativă a cetoacizilor, aminoacizilor, în metabolismul unor cetoglucide etc. Vitamina B_1 în stare liberă sau esterul său monofosforic nu au activitate carboxilazică, dar invers TPP și esterul monofosforic al tiaminei au activitate vitaminică. TPP reprezintă principala formă în care tiamina funcționează în calitate de coenzimă. TPP este mult mai stabil decât tiamina la aceleași valori de pH.

Formarea cocarboxilazei s-a realizat atât pe cale enzimatică, cât și chimică. Biosinteza TPP are loc sub acțiunea unor fosfokinaze având ca donor de acid pirofosforic, acidul adenozintrifosforic (ATP), sau sub acțiunea unor fosfomutaze, la care donorul de fosfat este acidul fosfo-

Scanned with OKEN Scanner

gliceric sau acidul fosfopiruvic. Reacția de fosforilare necesită prezența unor cantități mici de AMP și ADP, fiind un proces reversibil foarte rapid în organism. Prin sinteză TPP se obține ușor din tiamină și oxiclorura de fosfor.

TPP prin combinare cu o enzimă specifică, formează decarboxilaze enzime care participă la numeroase reacții de oxidoreducere din organism, în special în procesul de respirație. Prin trecerea reversibilă din forma tiolică în cea disulfidică, tiamina și TPP formează în celule un sistem oxidoreducător, care sub aspect chimic, se prezintă în figura 7.9.

Forma tiolică a tiaminei, sub acțiunea oxigenului, apei oxigenate și a altor oxidanți, poate trece în forma disulfidică, iar aceasta trece reversibil în forma tiolică sub acțiunea glutationului, cisteinei, tiohomoserinei etc. Transformarea N-pentavalent în N-trivalent, din heterociclul tiazolic, prin adiție de hidrogen, nu s-a dovedit reală în organism, deoarece dihidrotiamina este inactivă sub aspect biologic.

Rolul vitaminei B_1 în procesele metabolice s-a stabilit în stări de hipovitaminoză tiaminică, când s-a remarcat creșterea cantității de acid lactic în creierul porumbeilor, a metilglioxalului în laptele și urina femelelor carențate, a acidului piruvic și a corpilor cetonici în sângele și urina bolnavilor de beri-beri. În avitaminoza tiaminică s-a remarcat atât la om cât și la animale o acumulare de acid piruvic în diferite țesuturi și lichide din organism. Administrarea de tiamină duce la dispariția acestor fenomene, fapt ce dovedește că în carența de tiamină degradarea glucidelor se oprește la nivelul acidului piruvic. Aceste observații bazate pe numeroase date experimentale confirmă dependența metabolismului glucidic de tiamină, care stimulează și biosinteza lipidelor din glucide. Se poate remarca de asemenea că acidul piruvic are un rol însemnat în intercorelațiile metabolice care se stabilesc nu numai între glucide și protide, ci și între glucide și lipide.

TPP reprezintă partea activă a unor enzime care participă la decarboxilarea și dehidrogenarea unor cetoacizi, a unor aminoacizi și a unor transcetolaze. Dintre enzimele și reacțiile la care participă TPP fac

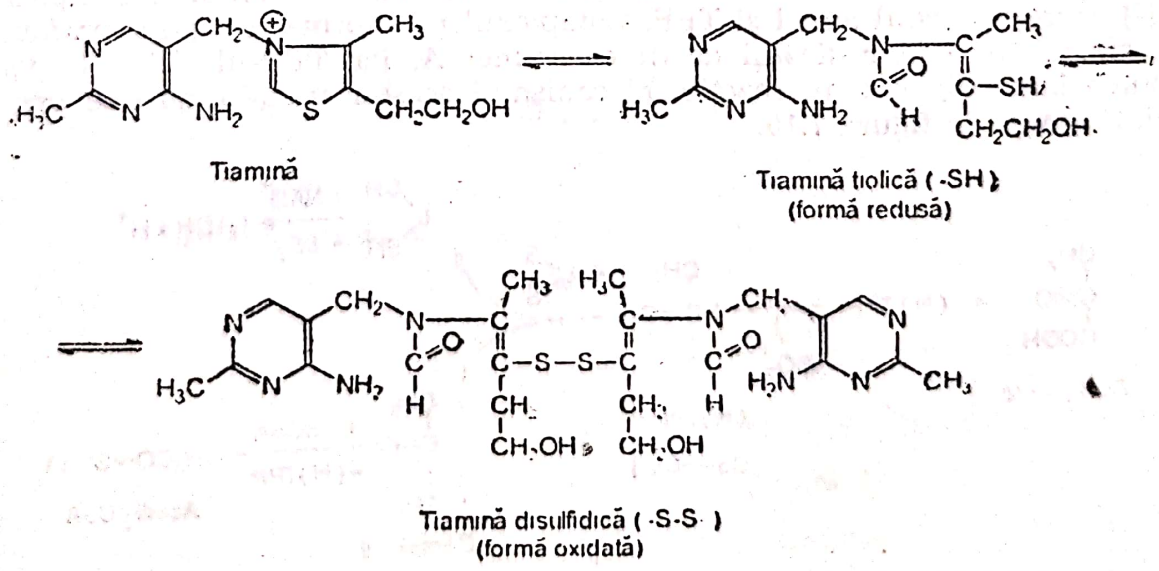
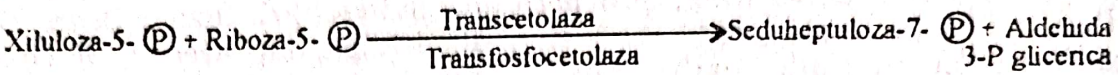


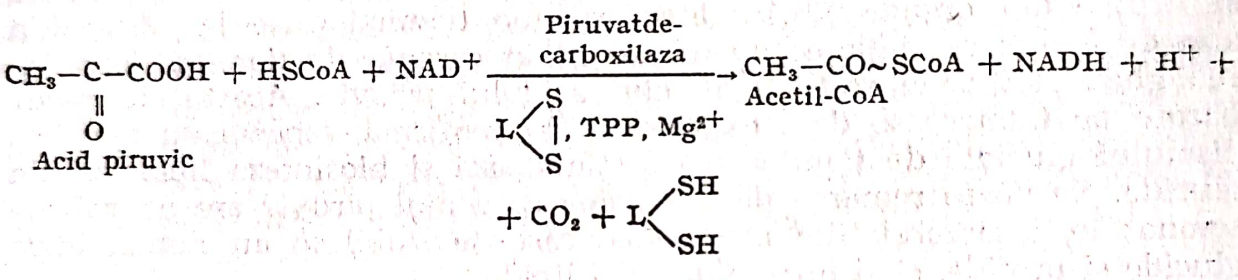
Fig. 7.9. Trecerea tiaminei și TPP-ului din forma tiolică în cea disulfidică

Scanned with OKEN Scanner

parte piruvatdecarboxilaza, care determină transformarea acidului piruvic în acetil-CoA și CO_2, complexul piruvatdehidrogenaza care transformă acidul piruvic în aldehida acetică și CO_2, complexul de α-cetoglutaraldehidrogenaza care determină decarboxilarea acidului α-cetoglutaric, transcetolaze și fosfocetolaze, care catalizează transferul unui fragment glucidic cetonic, cu oxigen la C-2 sau aldehida acetică activă de pe un substrat pe altul, în special de pe o monoglucidă pe alta, cu formarea unor noi monoglucide. Ca exemplu se poate menționa reacția:



Decarboxilarea cetoacizilor decurge simultan cu oxidarea produșilor primari ce rezultă în urma decarboxilării. Decarboxilarea oxidativă a acidului piruvic (și a altor cetoacizi) are loc sub influența piruvatdecarboxilazei care conține TPP, în prezența HSCoA, L-acidului lipoic (LS_2), ATP, NAD^+, Mg^{2+} și a altor cofactori, obținându-se ca produs final acetil-CoA ($CH_3CO \sim SCoA$). Acest proces este inițiat de TPP cu formarea acetaldehidei active și poate fi redat simplificat prin următoarea relație:



În ce privește mecanismul acestei reacții s-a stabilit că pe suprafața enzimei, acidul piruvic este decarboxilat de către TPP și se formează un complex (I) al adehidei acetice cu TPP-ul. Acesta va ceda doi atomi de hidrogen acidului lipoic (LS_2), iar acidul lipoic redus (HS-L-SH) va ceda hidrogenul NAD^+-ului, formându-se concomitent un nou complex (II), între radicalul acetil și TPP. Complexul nou format tot pe suprafața enzimei, va ceda radicalul acetil coenzimei A, iar TPP-ul eliberat va putea intra din nou în reacție. Mecanismul acestor transformări se prezintă sumar în figura 7.10.

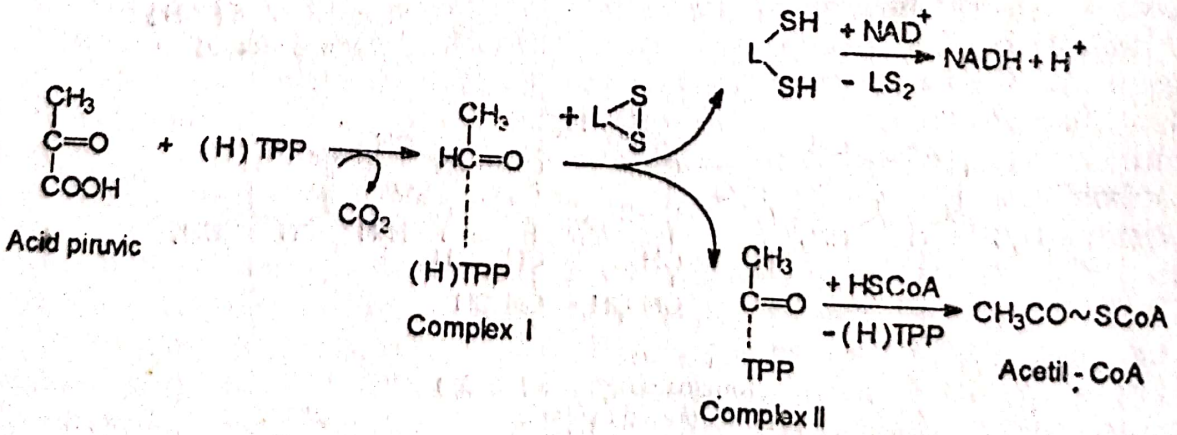


Fig. 7.10. Mecanismul transformării acidului piruvic în acetil-CoA

Scanned with OKEN Scanner

Acetil-CoA este un compus macroergic care printr-un proces exergonic cedează cu uşurinţă radicalul acetil, contribuind la sinteza acizilor graşi, a sterolilor şi a numeroase terpene. Ea face legătura metabolismului glucidelor cu a lipidelor. Se poate degrada oxidativ şi prin ciclu Krebs.

Un alt mecanism constă în legarea acidului piruvic la nivelul atomului α ce conţine atomul de oxigen de C-2' al nucleului tiazolic al TPP cu formarea compusului acid piruvic-TPP, care prin decarboxilare trece în acetaldehidă-TPP, care în prezenţa HSCoA şi NAD^+ va da naştere la acetil-CoA şi se va elibera TPP-ul. Legarea acidului piruvic de TPP şi eliberarea acetil-CoA se prezintă în figura 7.11.

Aceste reacţii sunt posibile deoarece C-2' din ciclul tiazolic este reactiv, iar în urma desprinderii H^+ legat de el, C-2' devine un carbocation, care se leagă de atomul C-2 din acidul piruvic, cu oxigenul cetonic. Acest compus de adiţie al acidului piruvic prin decarboxilare, sub

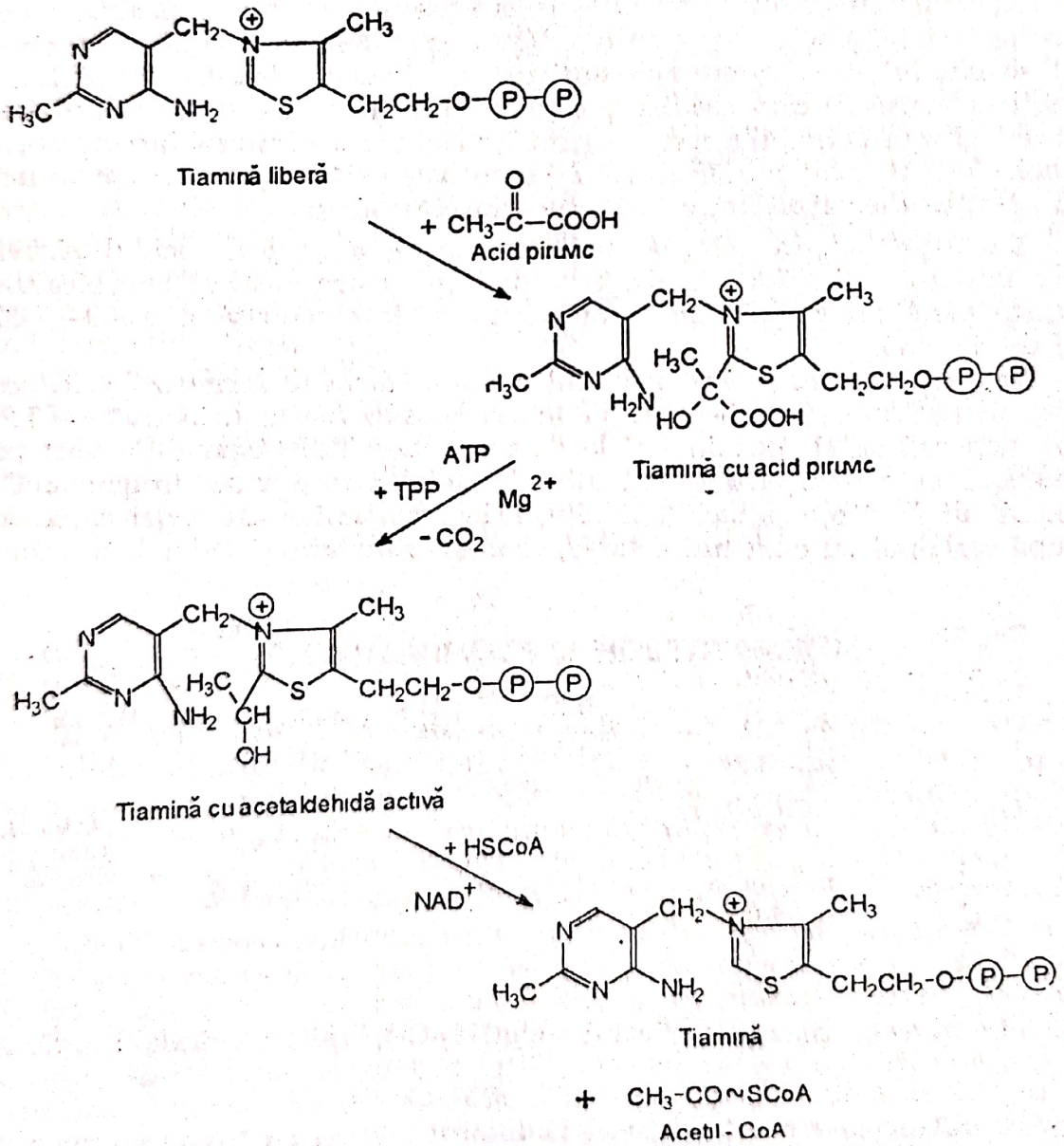


Fig. 7.11. Legarea acidului piruvic de TPP şi eliberarea acetil-CoA

Scanned with OKEN Scanner

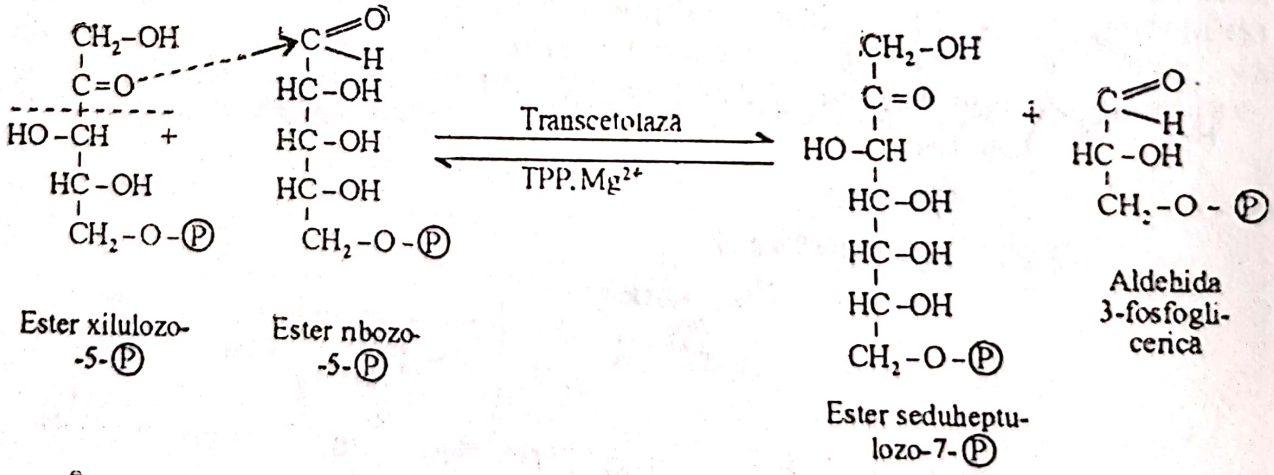
acțiunea TPP se transformă în hidroxietil-TPP, care prin eliberarea acetil-CoA reface tiamina inițială. În organism, această importantă reacție de decarboxilare se realizează sub acțiunea unui complex multienzimatic al piruvatdehidrogenazei în care pe lângă TPP mai participă acidul lipoic, acetil-CoA, NAD^+ și FAD. Nucleul tiazolic este absolut necesar pentru activitatea enzimatică în timp ce nucleul pirimidinic și sărurile de oxazoloniu sunt inactive. Produsul de reacție dintre TPP și acidul piruvic a fost sintetizat de Krapitz și colab., fiind extras ulterior din unele microorganisme și germeni de grâu. Dacă tiamina este fosforilată cu acid fosforic și apoi este uscată la 350°C se formează ca produs secundar esterul trifosforic .TTP), care în mediu alcalin se hidrolizează în TPP și acid fosforic. TPP posedă numai 25% din activitatea vitaminică a TPP.

În avitaminoza B_1 se produce o creștere a conținutului acidului piruvic din sânge și urină, prin blocarea decarboxilării acidului piruvic.

Acumularea acidului piruvic în organism determină apariția unor manifestări patologice care se manifestă prin fenomene toxice la nivelul sistemului nervos, crampe musculare, oboseală, iritații, instabilitate emoțională, modificări cardiace, edem, inflamarea nervului optic etc. Apar deficiențe în eliberarea energiei prin metabolizarea incompletă a glucidelor. Mușchii inimii și cei ai tubului digestiv își pierd tonicitatea cu apariția unor afecțiuni cardiace și gastrointestinale.

La porumbei, în stări de avitaminoză B_1 alături de acidul piruvic se acumulează și acidul lactic, care determină convulsii și bradhicardie. Aceste afecțiuni dispar după administrarea intravenoasă a 2 000—5 000 UI de tiamină.

În cazul decarboxilării acidului α-cetoglutaric se formează prin aceleași mecanisme succinil-CoA. Vitamina B_1 sub forma sa activă de TPP funcționează ca și coenzimă și la transcetolaze. TPP legat de o proteină specifică determină transferul glicoaldehidei sau a unui fragment C-2 cetonic de la o monoglucidă la alta, prin fragmentarea catenei carbonice după carbonul cu oxigenul cetonic, conform relației:



În această reacție radicalul $C_2(CH_2\text{-}C\text{-})$ (OH, O), glicoaldehida activă s-a transferat de la esterul xilulozei la esterul ribozei cu formarea unor noi esteri monoglucidici. Transcetolazele catalizează deci transferul unei

„aldehide active", a unui fragment 2-cetocarbonilic de la o monoglucidă la alta, de pe un substrat pe altul cu grupări aldehidice.

Reacțiile catalizate de transcetolaze predomină în ciclul pentozofosfaților, fapt ce influențează ca în stări de hipovitaminoză B_1 să crească anormal conținutul de pentoze în sânge și eliminarea acestora prin urină. În eritrocite, unde această cale este mai intensă, acumularea pentozelor este mult mai accentuată. Tratamente efectuate cu vitamina B_1 duc la vindecarea acestor tulburări biochimice. Asupra colinesterazei, vitamina B_1 are o astfel de acțiune de inhibare, favorizând transmiterea impulsului nervos de la nervi la țesuturi, prin conservarea mediatorului chimic care este colina. Vitamina B_1 joacă astfel un rol important în echilibrul sistemului nervos, în transmiterea impulsului nervos la nivelul sinapselor, similar acțiunii aceticolinei.

Tiamina numai în doze mari pare să potențeze efectul acetilcolinei, prin inhibarea acțiunii colinesterazei. Pe de altă parte, unii autori susțin efectul sinaptolitic a dozelor mari de tiamină, acetilcolină, norepinefrină și serotonină în transmiterea impulsului nervos.

Tiamina determină apariția mai multor efecte farmacologice la animalele de experiență, dar numai după adminstrarea parentală a unor doze mari de tiamină, de 1 000 de ori mai mari față de necesarul normal. Prin administrarea intravenoasă a unor doze de 5 la 50 mg/kg greutate corp se produce la câini și pisici o cădere a presiunii sanguine, care oricum crește din nou la doze încă destul de mari. Dozele mari de tiamină la câine provoacă bradilardie. În doze mari, pe lângă blocarea efectului ganglionar, tiamina influențează transmiterea stimulilor neurali la mușchii scheletici. Dozele mari de tiamină (10—30 g UI) pot avea la unii oameni efect anestezic și analgezic.

Timpul de înjumătățire a „vieții" tiaminei în corp este de 5,5—19,5 zile. Majoritatea produșilor săi de degradare se elimină prin urină. Tiamina favorizează, pe de altă parte, absorbția oxigenului, metabolizarea glucidelor și biosinteza lipidelor din glucide. Stimulează pofta de mâncare și activează mișcările peristaltice ale intestinelor.

7.8. HIPOVITAMINOZE ȘI HIPERVITAMINOZE

Hipovitaminoza B_1 se întâlnește extrem de rar la persoanele cu o alimentație echilibrată, datorită numeroaselor surse de tiamină din hrană, precum și cea furnizată prin activitatea florei intestinale endofite. În cadrul unui dezechilibru alimentar (alcoolism, afecțiuni gastrointestinale grave, consum exagerat de dulciuri etc.), poate surveni o policarență vitaminică, dominată de o avitaminoză B_1.

Tabloul clasic al carenței de tiamină la om este cunoscut sub denumirea generică de boala beri-beri, care se manifestă în general prin modificări degenerative ale sistemului nervos, cu multiple nevrite periferice, cu hipertrofie cardiacă și dilatarea miocardului. Hipovitaminoza B_1 apare frecvent la alcoolici și la un consum exagerat de dulciuri, care epuizează rezervele de vitamină și determină apariția unor boli gastrointestinale, cardiace și ale sistemului nervos, în special apariția polinevritelor.

Scanned with OKEN Scanner

La om hipovitaminoza tiaminei se manifestă prin tulburări ale sistemului nervos, pierderea poftei de mâncare, oboseală, tulburări gastrointestinale, dureri de cap, iritabilitate, tulburări de memorie, palpitații, gâfâieli, iar în cazuri mai grave apar polinevrite, nevralgii, convulsii, și paralizii ale extremităților. Polinevritele au aspect specific, fiind simetrice, bilaterale și apar frecvent la extremități. Simptomele paralitice care apar la porumbei sunt folosite ca test biologic al tiaminei.

Avitaminozele B_1 se manifestă în special prin tulburări cardiovasculare și ale sistemului nervos.

Avitaminoza cardiovasculară se manifestă prin tahicardie, dureri precardiale, insuficiență cardiacă, iar forma severă determină moartea organismului.

Avitaminoza B_1 de origine nervoasă poate afecta sistemul nervos periferic sau central. Avitaminoza nervoasă periferică se manifestă prin convulsii și paralizii ale membrelor inferioare și superioare. Avitaminoza centrală se manifestă prin tulburări de nutriție (dizenterie, vărsături), tulburări ale vederii, confuzie mintală etc. Surmenajul, alcoolismul, bolile infecțioase favorizează apariția hipo- și chiar avitaminozei B_1

Cel mai expresiv test biochimic în stabilirea carenței vitaminei B_1 constă în determinarea indicelui metabolic al glucidelor, conform relației $G = 1/2 (L - 15P)$, unde L reprezintă nivelul lacticemiei, P nivelul piruviemiei, iar G nivelul glicemiei. Valori de peste 15 ale acestui indice indică existența unei carențe vitaminice.

În encefalopatia hemoragică, numită și „beri-beri central" apar tulburări vizuale grave, o slăbire accentuată, hemoragii, confuzii mintale, apar focare de congestie hemoragică și degenerescență în talamus.

Boala beri-beri reprezintă forma cea mai răspândită în stările de hipovitaminoză B_1. Ea se datorește unei stări carențiale cronice care poate dura ani de zile. La un moment dat, datorită unor afecțiuni patologice sau unei epuizări fizice, ea se manifestă acut. Apar tulburări nervoase (polinevrite ale membrelor), cardiace, atrofie musculară cu mers greoi (beri-beri în limba indiană înseamnă cătușe la picioare), paralizii ale membrelor, dureri musculare profunde, tremurături, constipații rebele. În cazul avitaminozei cardiace apare o miocardiopatie cu hipertrofia inimii, tahicardie constantă, palpitații, dureri precordiale, edem generalizat etc. Bolnavul are fața „umflată", prezintă stări repetate de asfixie și sufocare, iar în final survine moartea. Formele mai ușoare de hipovitaminoză B_1 se manifestă prin tulburări funcționale ale sistemului nervos, astenie, pierderea apetitului, oboseală fizică și intelectuală, afecțiuni gastrointestinale, scăderea corpului în greutate.

Boala beri-beri apare încă destul de frecvent la copiii nou-născuți din unele regiuni ale Extremului Orient. Aceasta se datorește avitaminozei B_1 la mame. Boala se manifestă sub forme diferite, similare adultului, afectând atât sistemul nervos cât și aparatul cardiovascular. Apare o asistolie acută, agitație, cianoză, tahicardie (până la 200 bătăi/minut), convulsii, stare semicomatoasă, paralizia nervilor cranieni, precum și tulburări digestive, regurgitații, anorexie, constipație, edeme etc. (BEDELEANU, 1985).

La porumbei, în stări de avitaminoză B_1 s-a constatat apariția de convulsii, tulburări cardiace însoțite de tahicardie, necrozarea mușchiu-

Scanned with OKEN Scanner

lui cardiac, descompunerea tecii mielinice a nervilor, degenerarea nervilor și paralizia animalului. În majoritatea cazurilor aceste simptome dispar după administrarea de tiamină.

Șobolanii hrăniți cu o dietă săracă în tiamină scad în greutate, își pierd apetitul, apar fenomene de aclorhidrie, convulsii și bradicardie. La femele se produce dereglarea procesului de reproducere și lactație.

La porcine simptomele care apar în carența de vitamina B_1 sunt similare cu ale șobolanilor, fiind însoțite de anorexie, vomă, cianoză, dispnee, dar simptomele neurologice sunt mult atenuate.

La maimuță *(Macaea mulatta)* în stări de carență a vitaminei B_1 se produce o scădere în greutate a corpului, atonie musculară, lipsa poftei de mâncare, dispariția reflexelor, convulsii, incoerență în coordonarea mișcărilor, semne de insuficiență cardiacă, paralizie și moartea animalului.

La unii pești a fost pusă în evidență tiaminaza, enzimă termolabilă, care distruge structura tiaminei. Datorită acestei enzime, vulpile argintii din crescătorii hrănite cu mult pește crud, sufereau de hipovitaminoză B_1 care se manifestă prin slăbiciuni musculare, ataxie, anorexie și paralizie.

Tulburările organelor de simț în stări de hipovitaminoză tiaminică, sunt rezultatul degenerării fibrelor nervoase.

Hipervitaminoza B_1 la om și la animale apare în cazul unor condiții speciale, în afecțiuni de absorbție și metabolizare ale vitaminei B_1 sau în cazuri experimentale.

Omul adult tolerează doze de 500 mg tiamină pe zi, timp de o lună, fără să apară fenomene negative. Cu toate acestea, dozele mari de tiamină, administrate o perioadă îndelungată, pot determina apariția unor fenomene alergice, nervozitate, amețeli, dureri gastrice, vărsături, vasodilatație periferică, scăderea frecvenței respirației și moartea prin paralizarea centrului respirator.

Unele afecțiuni sunt similare cu cele care apar în stări de hipertiroidism.

7.9. TOXICITATE ȘI FARMACOLOGIE

Pe cale experimentală s-a demonstrat că vitamina B_1 adiministrată în doze mari o perioadă mai îndelungată, are acțiune toxică asupra unor procese metabolice, atât la om cât și la animale. Efectele toxice dispar numai după eliminarea tiaminei aflată în exces.

La animalele de experiență administrarea unor doze masive de vitamină B_1 determină apariția de spasme, tetanie musculară, tulburări respiratorii, nervoase și cardiace.

Doza toxică variază la animale între 125—350 mg/kg corp, administrată pe cale venoasă. Dacă administrarea tiaminei se face subcutanat, doza toxică este de 6 ori mai mare decât cea administrată pe cale venoasă, iar pe cale bucală, doza trebuie să fie de 40 ori mai mare. La șoarece, o doză de 100 mg/kg corp determină moartea animalului în 3 zile. Administrarea unor doze de 150 mg/kg corp determină moartea

Scanned with OKEN Scanner

tuturor animalelor. Pe cale subcunatată este necesară o doză de 1 g/kg corp pentru a surveni moartea la 2 animale din 3, în timp de 20 de minute, iar administrarea pe cale bucală necesită doze de 3 g/kg corp pentru a provoca același efect. La maimuța *Macacus rhesus*, doza toxică de tiamină este de 600 mg/kg corp.

Pe cale experimentală s-a demonstrat că administrarea a 100 µg tiamină pe zi la șobolani, femelele din generația a doua devin sterile, iar dacă doza zilnică este de 200—400 µg, în laptele femelelor apare un factor toxic, iar a treia generație de șobolance au perioada de lactație suprimată. Dozele letale pentru iepuri variază între 126—160 mg/kg corp, iar animalele mor din cauza unei paralizii a sistemului nervos central. Efecte farmacologice negative apar la animalele de experiență numai dacă li se administrează pe cale orală doze de tiamină de 1 000 de ori mai mari decât cerințele normale. Dacă administrarea dozelor de vitamina B_1 se face pe cale subcutanată, musculară sau intravenoasă, dozele toxice sunt mult mai mici. Astfel, dacă se administrează intravenos, doze de 5 la 50 mg/kg corp, la câini și pisici se produce o cădere accentuată a presiunii sanguine, care își revine la normal numai după eliminarea excesului de vitamină.

La unele persoane, acțiunea toxică a vitaminei B_1 administată intramuscular se manifestă chiar la un conținut de 50 mg. Aceste fenomene apar mai rar, în mod deosebit la persoanele cu intoleranță sau hipersensibilitate la tiamină și se manifestă prin simptome diferite (nervozitate, tahicardie, amețeli, greață, dureri gastrice, eriteme etc.). Frecvența acestor manifestări este redusă și poate fi pusă pe seama unor sterilizări defectuoase, mai cu seamă că apar la persoane ce primesc injecții repetate. Testul intradermic privind sensibilizarea vitaminei B_1 nu dă indicații valabile.

La soarece doza de 50 mg/kg corp, administrată pe cale venoasă provoacă o ușoară stare de agitație. La o doză de 75 mg/kg corp apar afecțiuni gastrointestinale, cardiace și nervoase mai accentuate, iar la doze de 100 mg/kg corp survine moartea animalelor în proporție de 60%.

Indicele terapeutic al vitaminei B_1, adică raportul dintre doza terapeutică minimă și doza toxică minimă este foarte bun, având valori cuprinse între 1 : 7 200 și 1 : 36 000, fapt ce denotă că vitamina B_1 administrată în doze normale nu este toxică.

Tiamina este în general bine tolerată de organismele animale chiar dacă este administrată în doze de sute de ori mai mari decât necesitățile normale, fără să apară simptome de toxicitate. La om de asemenea, doze mari de tiamină administrate mai multe luni sunt de obicei inofensive și nu cauzează schimbări patologice în sânge sau la diferite organe.

Toxicitatea tiaminpirofosfatului reprezintă numai o treime până la unu și jumătate din toxicitatea clorhidratului de tiamină. După administrarea unei doze letale de clorhidrat de tiamină intravenos, animalul moare în condițiile unei stări de slăbire accentuată, cu vasodilatație periferică, cădere abruptă a frecvenței respirației, apariția convulsiilor și paralizarea centrului respirator.

În tabelul 7.2 se prezintă doza acută de toxicitate (DL_{50}) a clorhidratului de tiamină, exprimată în mg/kg greutate corp. Doza toxică (DL_{50}) la șoarece pentru tiaminpirofosfat este de 630 mg/kg corp dată intra-

Scanned with OKEN Scanner

Tabelul 7.2

Doza toxică (DL_{50}) a clorhidratului de tiamină administrată oral și prin injecții la animale de experiență, exprimată în mg/kg corp

Specia	Mod de administrare			
	Oral	Subcutanat	Intravenos	Itraperitoneal
Șoarece	8 200—13 300	>500	85—250	350
Șobolan	12 300	1 500	200—250	—
Iepure	1 800	—	100—300	—
Câine	—	2 100	—	—
Maimuță	100	—	>200	Intramuscular >600
Porumbel	>300	—	<100	Intramuscular <100

venos și de 560 mg/kg corp la iepuri (intravenos), fiind cu mult mai mare decât cea a clorhidratului de tiamină.

Dozele subcronice și cele cu toxicitate cronică (DL_{50}) de clorhidrat de tiamină pe durata de 10 zile sunt la șoarece de 13 300 (oral), 85 (i.v.), 350 (i.p.), iar la șobolan de 12 300 (oral), 200 (i.v.), în timp ce a tiamin-pirofosfatului sunt la șoarece de 630 (i.v.), iar la șobolan de 560 (i.v.).

7.10. INTERRELAȚII CU ALTE VITAMINE ȘI HORMONI

Vitamina B_1 manifestă o acțiune de protejare a vitaminei C, prin acțiunea sa asupra agenților oxidanți. Vitamina B_1 întârzie apariția scorbutului experimental, iar acțiunea antiscorbutică a vitaminei C este stimulată (potențată) de vitamina B_1. Interrelațiile biologice cu vitamina A sunt mai complexe. Unii cercetători au remarcat o creștere a avitaminozei B_1 concomitent cu creșterea conținutului vitaminei A. Această relație ar fi deci antagonică. Pe de altă parte s-a raportat că în stări de avitaminoză A se intensifică și simptomele avitaminozei B_1, fapt ce reflectă o relație neantagonică.

Excesul de vitamină PP și acizi folici inhibă efectul vitaminei B_1 în vindecarea polinevritei aviare, prin inhibarea fosforilării tiaminei, iar doze mari de vitamina B_1 administrate animalelor experimentale agravează afecțiunile care apar în hipovitaminoză PP și B_6. Vitamina B_6, acidul pantotenic și biotina au efecte sinergice cu vitamina B_1 în numeroase procese metabolice. Între conținutul vitaminei B_{12} și B_1 se stabilesc relații de proporționalitate. Un consum mărit de vitamina B_{12} necesită un conținut ridicat de vitamină B_1 și invers.

Vitamina B_1 are o eficiență mult mai mare în metabolizarea acidului piruvic, în prezența acidului pantotenic și a colinei, întrucât aceste vitamine au o acțiune sinergică asupra metabolismului glucidic. Lipsa colinei și a acidului pantotenic micșorează viteza de oxidare a acidului piruvic.

Interrelații eficiente se stabilesc și între acțiunea vitaminelor B_1 și B_2. În stări de hipovitaminoză tiaminică se produce o resorbție scăzută a vitaminei B_2 și o eliminare mai accentuată a acesteia prin urină. Vitamina B_2 nu se poate depozita în ficat numai la un conținut normal al vitaminei B_1 în sânge și în celelalte lichide biologice.

Scanned with OKEN Scanner

Vitaminele P și pigmenții flavonoidici accelerează degradarea tiaminei prin activarea tiaminazelor. Unii autori consideră vitaminele P și pigmenții flavonoidici cu grupări OH libere pe nucleul benzenic, ca „antivitamine B_1 naturale".

Antibioticele scad necesitățile în vitamina B_1 la șobolanii aflați în stări de hipovitaminoză, probabil datorită degradării florei intestinale care consumă tiamina și nu o produc. La om, tratamentele cu antibiotice și sulfamide, aplicate parenteral, trebuie însoțite de o hrană bogată în tiamină și de substanțe care stimulează refacerea florei intestinale endofite.

Vitamina B_1 inhibă atât formarea cât și activarea colinesterazei, enzimă care determină scindarea acetilcolinei, favorizând astfel transmiterea influxului nervos la nivelul sinapselor. S-a remarcat pe de altă parte, că prin excitarea nervilor periferici se produce tiamină.

În avitaminoza B_1 se produce o hipertrofie a zonei corticale a glandelor suprarenale, care afectează biosinteza hormonilor corticosuprarenali. Există interrelații metabolice sinergice între tiroxină și tiamină, precum și între insulină și tiamină, fapt ce determină o rezistență mai mare a organismului sub acțiunea tiaminei, în stările carențiale de tiroxină și insulină. În stări de hipovitaminoză B_1 activitatea hipofizei este redusă cu repercusiuni mari asupra proceselor metabolice din organism, care sunt influențate de hormonii hipofizari. La șobolan, derivatul acetilic al tiaminei are o acțiune similară cu a acetilcolinei la nivelul tubului digestiv.

Dintre elementele minerale, Mg, Fe, Zn, Mn, stimulează activitatea tiaminei. În avitaminoza tiaminei se remarcă o scădere a zincului. Magneziul este un element care stimulează reacțiile de carboxilare și decarboxilare, de fosforilare și oxidoreducere. Carboxilaza din drojdii este un complex tiaminpirofosfat-Mg-proteic. Magneziul ușurează stabilirea legăturii TPP din decarboxilaze cu substratul asupra cărora acționează.

Cunoașterea interrelațiilor metabolice dintre vitamine este de mare importanță pentru asocierea vitaminelor în aplicarea unor scheme de tratament pentru vindecarea unor avitaminoze.

7.11. ANALOGI STRUCTURALI ȘI ANTIVITAMINE B_1

Se cunosc mai multe antivitamine B_1 atât naturale cât și obținute prin sinteză, care au o structură moleculară analogă cu vitamina B_1.

Compușii obținuți prin sinteză au confirmat că activitatea biologică a vitaminei B_1 se datorește ciclului pirimidinic și respectiv tiazolic, punții metenilice, grupării aminice și metilice etc. Schimbarea unor substituenți din molecula tiaminei poate duce la obținerea de noi compuși cu activitate vitaminică mai mare sau mai mică, precum și obținerea de antivitamine. Izomerii tiaminei care au grupările $—NH_2$ și $—CH_3$ invers grefate pe nucleul pirimidinic nu posedă activitate vitaminică. Esterii tiaminei (monofosfat, acetat, benzoat de tiamină) au o acțiune curativă mai prelungită decât tiamina. De asemenea sărurile tiaminei cu halogenii sunt activ biologic.

Scanned with OKEN Scanner

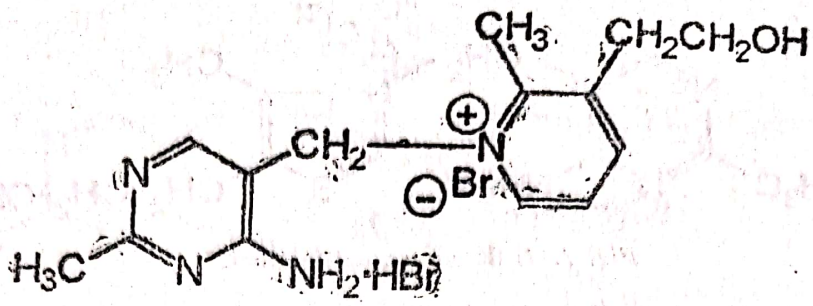


Fig. 7.12. Structura piritiaminei (heterovitamina B_1)

Prin sinteză, s-a obținut piritiamina sau heterovitamina B_1 (fig. 7.12), în care nucleul tiazolic este înlocuit cu nucleul piridinic. Activitatea biologică a acestui compus este de 26 de ori mai mică decât a vitaminei B_1, iar dacă gruparea metilică de la C—2 este îndepărtată, activitatea biologică a noului compus va fi mai mică de 240 de ori.

Piritiamina inhibă creșterea microorganismelor pentru care vitamina B_1 constituie un factor de creștere (*Phycomyces blakesleeamus*, *Phytophtora ciannamoni*, *Staphylococcus aureus* etc.), comportându-se ca antivitamină.

Piritiamina s-a obținut prin înlocuirea sulfului din nucleul metiltiazolic cu o grupare vinilică (—CH=CH—). Ea este un antimetabolit tiaminic esențial.

Acțiunea antagonistă piritiamină ⇄ tiamină s-a experimentat pe șoareci, la care injecția de piritiamină provoacă simptome clasice de avitaminoză B_1. Administrarea de vitamină B_1 anihilează efectele piritiaminei. Piritiamina inhibă fosforilarea tiaminei și are acțiune antivitaminică la unele bacterii și determină hipovitaminoză B_1 la șobolani.

Un alt omolog structural al tiaminei cu acțiune antivitaminică este *neopiritiamina* (fig. 7.13), cu o acțiune antagonistă mult mai mare decât piritiamina. Acest compus administrat prin hrană, produce la șoareci polinevrite cu paralizarea treptată a membrelor și apariția de perturbări neuromusculare. Această antivitamină micșorează acumularea acidului glutamic în sânge, inhibă ciclul Krebs și determină scăderea TPP din creier.

Oxitiamina (fig. 7.14), se obține prin tratarea tiaminei cu acid nitros. Această antivitamină B_1 administrată la animalele de experiență a determinat scăderea greutății corporale, creșterea acidului lactic și a

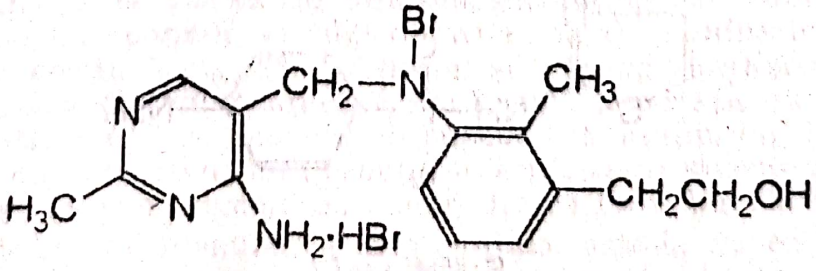


Fig. 7.13. Structura neopiritiaminei

Scanned with OKEN Scanner

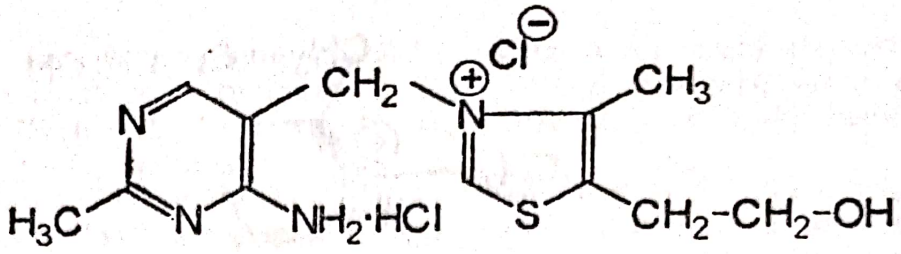
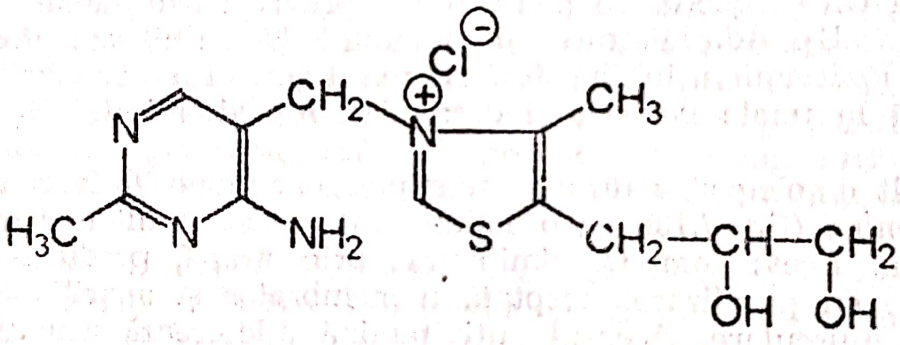


Fig. 7.14. Structura oxitiaminei.

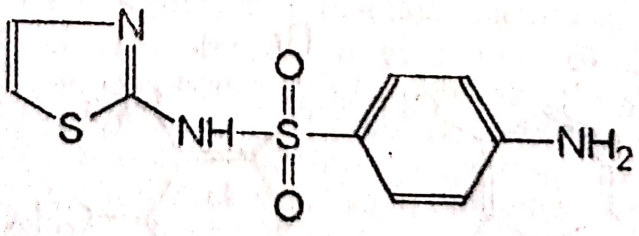
acidului piruvic în sînge, eliminarea accentuată a tiaminei prin urină. Oxitiamidondifosfatul inhibă decarboxilarea acidului α-cetoglutaric. Toxicitatea oxitiaminei la șoareci este în raport de 25 la 1 în comparație cu tiamina. Oxitiamina se deosebește de tiamină prin substituirea grupării $—NH_2$ de la C—2 al nucleului pirimidinic cu o grupare —OH.

Homotiaminglicolul și *sulfatiazolul* (fig. 7.15) au de asemenea activitate antitiaminică, bazată pe analogie structurală.

Pe cale experimentală s-a remarcat că numeroși derivați ai unor 6-aminopirimidine au acțiune antivitaminică B_1. Pe lângă acești analogi structurali, cu acțiune antivitaminică competitivă, mai există și alte substanțe, mult diferite structural, față de vitamina B_1, care administrate animalelor produc simptome similare avitaminozei B_1. Boala beri-beri se poate produce experimental și prin administrarea de acid piruvic, metilglioxal, acid uric etc. De asemenea, un regim foarte bo-



Homotiaminglicol



Sulfatiazol

Fig. 7.15. Structura homotiaminglicolului și a sulfatiazolului

Scanned with OKEN Scanner

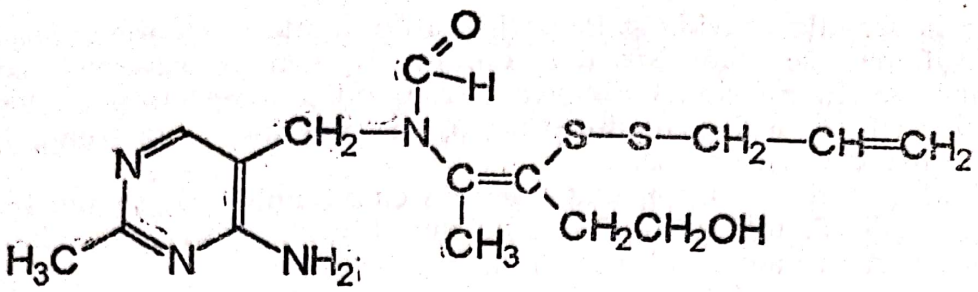


Fig. 7.16. Structura aliltiaminei

gat în glucide, determină apariția simptomelor de avitaminoză B_1, datorită consumului ridicat de TPP necesar metabolizării masive a glucidelor. În acest caz, excesul de glucide se comportă indirect ca „antivitamină B_1".

Aliltiamina este o antivitamină naturală, care se găsește în usturoi, ceapă, praz etc. Tiamina suferă o inactivare în contact cu plante din genul *Allium*. Aliltiamina (fig. 7.16) constituie un factor de creștere pentru unele microorganisme, probabil datorită transformării ei în tiamină.

Tiaminaza reprezintă o antivitamină B_1 de natură enzimatică. Ea catalizează desfacerea tiaminei în două componente, una cu heterociclu pirimidinic și cealaltă cu heterociclu tiazolic. Degradarea tiaminei se face în mod treptat, prin fixarea nucleelor heterociclice pe diferiți acceptori. Tiaminaza este o enzimă cu caracter albuminic, cu masa moleculară de 40 000 U.M.A. și cu activitate maximă la pH-ul optim de 5,0. Descoperirea acestei enzime se datorește observației că vulpile argintii și nurcile hrănite cu pește crud manifestau o paralizie accentuată, denumită „paralizia Chastek", care cedează la administrarea vitaminei B_1. Tiaminaza se găsește în cantitate mai mare în carnea peștilor dulcicoli, iar ulterior s-a identificat în inima și splina iepurilor și a găinilor. Prin fierbere, tiaminaza își pierde proprietățile antivitaminice.

Tiamina îndeplinește și rolul de transferază, întrucât catalizează reacția de transfer a pirimidinei, provenită din degradarea tiaminei, pe alt acceptor adecvat. Ea are un rol însemnat și în biosinteza acidului pteroilglutamic.

7.12. PREPARATE FARMACEUTICE ȘI INDICAȚII TERAPEUTICE

Vitamina B_1 se găsește în farmacii sub formă de tablete sau fiole. Tabletele au un conținut variabil de vitamina B_1 cuprins între 5 și 25 mg. Fiolele conțin 5 mg, 25 mg (forte) și 100 mg (fortissime) de vitamina B_1. Calea de administrare variază după necesitate, orală sau parenterală. Parenteral se dau injecții subcutanat, intravenos, intramuscular și mai rar intraperitoneal. Soluția injectabilă cu vitamina B_1 are un pH acid așa încât se recomandă administrarea intramusculară.

Preparatele cu vitamina B_1 sunt utilizate atât la oamenii adulți cât și la copii pentru tratarea afecțiunilor provocate de avitaminoza B_1, pentru creșterea rezistenței la infecții etc. Aceste preparate se dau pro-

Scanned with OKEN Scanner

filactic la femeile gravide și în perioada de alăptare a noilor născuți. În doze mai mari se administrează vitamina B_1 pentru tratarea afecțiunilor nervoase, în nevrite, polinevrite, în paraliziile nervului oculomotor, în tulburările neurologice din pelagră, în nevralgii, migrene, în nevrite, în herpesul zoster etc.

În afecțiunile cardiace, tratamentele cu vitamina B_1 se fac în insuficiență cardiacă, miocardie, în alcoolism, hipertiroidism, în scleroze și stări degenerative ale bătrânilor, în stări febrile etc.

Vitamina B_1 se folosește și în tratarea afecțiunilor hepatice și pancreatice, în diabet, hepatită epidemică sau cronică, pentru stimularea funcției de detoxifiere a ficatului, precum și în unele afecțiuni dermatologice. În terapia modernă se folosesc preparate cu TPP în fiole de 50 mg în tratarea hiperpiruvicemiei, cu efecte favorabile privind eliminarea corpilor cetonici și normalizarea rezervei alcaline a sângelui. TPP se folosește frecvent în tratarea diabetului, în stări de comă, rezistență la insulină, la șoc insulinic etc. La gravide se aplică în stări de toxicoză, în stări de acidoză, în intoxicațiile cu somnifere și diferite gaze. În afecțiunile cardiace TPP se administrează în compensările cardiace și circulatorii, în scleroze multiple. Se mai folosesc tratamente cu TPP și în nevralgia trigemenului, nevrite, polinevrite etc. În lumbago, injecțiile cu TPP scad senzația dureroasă (BEDELEANU, 1985).

În general, tratamentele cu vitamina B_1 sunt efectuate în asociere cu alte vitamine din complexul B, deoarece deficiența în vitamina B_1 este asociată în numeroase cazuri cu deficiența altor vitamine B.

Tratamentul specific cu vitamina B_1 se realizează în vindecarea bolii beri-beri, în encefalopatii cu hemoragii, dereglări profunde ale sistemului nervos. În asemenea afecțiuni se administrează zilnic la adulți 100 mg vitamina B_1, iar în cazuri grave 200—300 mg.

Pentru tratarea afecțiunilor medii apărute în stări de hipovitaminoză B_1 se aplică 100 mg vitamina B_1 administrată oral tot a doua zi. În alcoolism și în encefalopatii, terapia trebuie să înceapă cu doze zilnice de 50 la 100 mg, iar în cazuri grave până la 200 mg. vitamină B_1 administrată parenteral. Apoi terapia se poate continua, în lipsa unor dereglări grave de absorbție, cu administrarea unor doze orale de tiamină de 100 la 300 mg/zi.

Vitamina B_1 se poate utiliza și pentru respingerea țânțarilor, nu ca atare, ci în urma degradării moleculei, cu formarea unor compuși sulfurici rău mirositori, care resping țânțarii. O bună parte din acești compuși sulfurici se elimină prin transpirație (sudoare). Acest tratament este eficient numai dacă țânțarii au mai multe surse de nutriție și nu numai sângele. Țânțarii flămânzi nu sunt respinși de acești compuși rău mirositori, de aceea persoanele care călătoresc în zone cu mulți țânțari sunt îndrumați să ia profilactic măsuri împotriva malariei. Este indicat a se lua 1200—1800 mg de vitamina B_1 pe cale orală, cu două zile înainte de a întreprinde călătorii în zone cu țânțari, cu scopul de a satura corpul cu compuși sulfurici rezultați din degradarea vitaminei B_1. Avantajul acestei terapii constă în aceea că după baie transpirația ce se va forma va conține și ea acești compuși respingători.

Preparatele farmaceutice *„Benevra"*, conțin în tablete 300 mg vitamina B_1, în drajeuri 100 mg, iar în fiole 100 mg/1 ml. Experimental s-a demonstrat că absorbția vitaminei B_1 se face mai eficient în partea

Scanned with OKEN Scanner

anterioară a duodenului, unde are loc și formarea TPP-ului prin fosforilarea tiaminei. Tiamina persistă în corp o perioadă mai îndelungată, timpul de înjumătățire este de 10—20 zile. Nivelul vitaminei B_1 din aceste preparate în sânge este de 3—4 μg/100 ml.

Ca regulă generală, necesarul de vitamina B_1 în funcție de valoarea energetică a alimentelor exprimată în calorii este de 0,4 mg/1 000 calorii. Dacă hrana este bogată în glucide trebuiesc mărite dozele de vitamina B_1.

În tratamentele profilactice și curative ale afecțiunilor metabolice determinate de starea carențială a vitaminei B_1 se pot folosi cu succes și ceaiuri, infuzii, macerate, tincturi homeopate, obținute din plante cu conținut ridicat de vitamina B_1. Utilizarea infuziilor din frunze de afin s-au dovedit eficiente în diabet, colibaciloză și tulburări circulatorii. Infuziile din frunze de coacăz negru și de crețușcă sunt indicate în tratarea anghinelor pectorale.

Dintre plantele cu conținut ridicat în vitamina B_1 fac parte afinul, coacăzul negru, pelinul, menta, melisa, frunze de paltin și de tei, rosmarin, verbina etc. Aceste preparate fitofarmaceutice au proprietăți tonice și au efect favorabil asupra sistemului nervos, a inimii, ficatului etc., contribuind la buna funcționare a organismului.

Scanned with OKEN Scanner

Capitolul 8. VITAMINA B_2

8.1. Scurt istoric 208
8.2. Structură moleculară 209
8.3. Proprietăţi fizice şi chimice 213
8.4. Metode de identificare şi dozare 216
8.5. Răspândire în natură 217
8.6. Absorbţie, eliminare şi necesităţi 219
8.7. Rol şi activitate biologică 220
8.8. Hipovitaminoze şi hipervitaminoze 222
8.9. Interrelaţii vitaminice şi hormonale 224
8.10. Antivitamine 225
8.11. Indicaţii terapeutice şi preparate farmaceutice 226

Numele oficial actual al vitaminei B_2 este de *riboflavină*. Anterior riboflavina se numea *vitamina G* şi respectiv *lactoflavină*, *ovoflavină*, *hepatoflavină*, *verdoflavină* şi *uroflavină*. Cei mai mulţi din aceşti termeni derivă de la sursa din care vitamina a fost iniţial izolată, respectiv din lapte, ouă, ficat, plante şi urină. Flavinele naturale fac parte din clasa pigmenţilor galbeni, cunoscuţi sub numele generic de *flavine*.

Vitamina B_2 are un rol important în reacţiile de oxidoreducere, în procesele de creştere şi dezvoltare, fiind prezentă în stare liberă sau sub formă de compuşi în toate celulele organismelor vegetale şi animale.

8.1. SCURT ISTORIC

Existenţa vitaminei B_2 în lapte a fost remarcată prima dată de *A. W. Blyth* în 1879, care a extras din zerul de lapte un pigment galben verzui, puternic fluorescent, căruia i-a atribuit numele de lactoflavină. Ulterior, în perioada anilor 1920—1932 acelaşi compus s-a extras din albuşul de ou, fiind numit ovoflavină, din ficat s-a extras hepatoflavina, iar din drojdii şi unele plante ierboase s-a extras verdoflavina, numită şi liocrom, care ulterior s-a dovedit a fi identic cu „fermentul galben", izolat de *Warburg* şi *Christian* în 1932 din drojdia de bere, menţionându-se rolul important al acestei enzime în respiraţia celulară. Identitatea lor moleculară a fost stabilită de *R. Kuhn* care a

arătat că lumiflavina se formează atât prin iradierea fermentului galben, cât și a ovoflavinei.

În 1926, *J. Goldberger* și *R. D. Lilie*, reușesc să izoleze din tărâțele de orez doi compuși, unul termolabil, cu acțiune antinevritică, care este vitamina B_1 și un compus termostabil, galben și fluorescent care este vitamina B_2, ce stimulează creșterea organismelor animale, iar în lipsa acesteia din hrană apar tulburări cutanante și oculare. În 1933, *R. Kuhn, P. György, T. Wagner-Juaregg*, menționează că sporul în greutate al animalelor depinde de cantitatea unui pigment galben fluorescent din hrană. În același an acești autori au reușit să obțină din albușul de ou și din zer în stare cristalină un pigment galben, care stimulează creșterea șobolanilor, fiind identificat de ei ca vitamina B_2. Prin administrarea acestui compus în hrana șobolanilor, în doză de 10 μg/zi, se produce o creștere în greutate de 10 g/săptămână față de lotul martor.

În 1934, *R. Kuhn* și *P. Karrer* reușesc să obțină vitamina B_2 prin sinteză. După stabilirea structurii moleculare a vitaminei B_2, confirmată și prin sinteză totală a acesteia, Consiliul Farmaciștilor și a Chimiștilor din S.U.A. îi atribuie denumirea generică de riboflavină, termen în care se includ toate flavinele naturale izolate anterior (lactoflavina, ovoflavina, hepatoflavina, verdoflavina, liocrom, uroflavina etc.), fiind compuși identici, extrași din surse naturale diferite. Termenul de riboflavină se datorește prezenței în moleculă a ribitolului, culorii galben-verzui și proprietăților sale fluorescente.

În 1937, *H. Theorell* stabilește cu siguranță structura flavinmononucleotidei (FMN) arătând că aceasta îndeplinește rolul de coenzimă în „fermentul galben respirator" și în alte sisteme enzimatice flavinice. *O Warburg* și *W. Christian* reușesc să determine în 1938 structura flavinadenindinucleotidei (FAD), stabilind totodată rolul de coenzimă a acestui compus în numeroase enzime de oxidoreducere. *W. H. Sebrell* descrie în 1941 simptomele clinice care apar în stări de hipovitaminoză B_2 experimentală la oameni, menționând printre altele că în hipovitaminoză încetează creșterea și apar tulburări oculare și dermice. În 1968, *Glatzle* și colaboratorii săi propun utilizarea glutationreductazei eritrocitare ca test pentru măsurarea activității riboflavinei (F. HOFFMAN LA ROCHE, 1994).

8.2. STRUCTURĂ MOLECULARĂ

Vitamina B_2 are formula elementară $C_{17}H_{20}N_4O_6$, iar sub aspect structural este formată dintr-un nucleu izoaloxazinic și ribitol (6,7-dimetil-9-(D-1'-ribitil)-izoaloxazina) de la care îi provine și numele de riboflavină (fig. 8.1).

Ribitolul este un polialcool cu C—5 și conține 4 grupări hidroxilice, care derivă de la riboză. Radicalul său numit ribitil, se leagă de nucleul izoaloxazinic prin N—9 din nucleul izoaloxazinic.

Izoaloxazina este o formă tautomeră a aloxazinei, care se obține din alcxan și orto-fenilendiamină printr-o reacție de condensare (fig. 8.2). Aloxanul derivă din acidul uric, din care se poate prepara prin oxidare cu acid azotic.

Scanned with OKEN Scanner

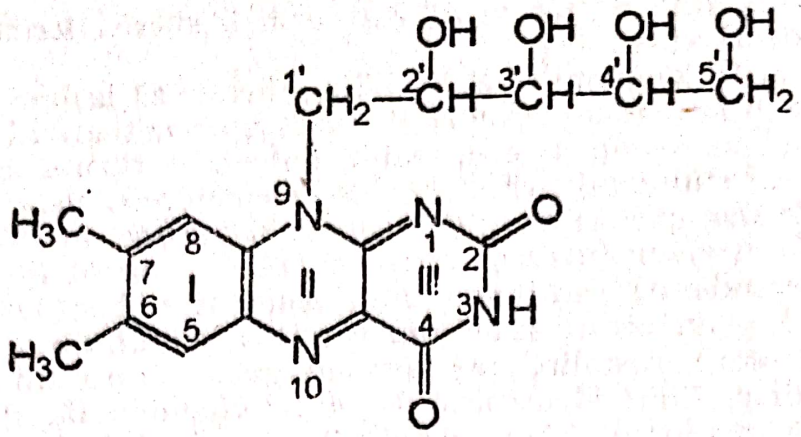


Fig. 8.1. Structura vitaminei B_2

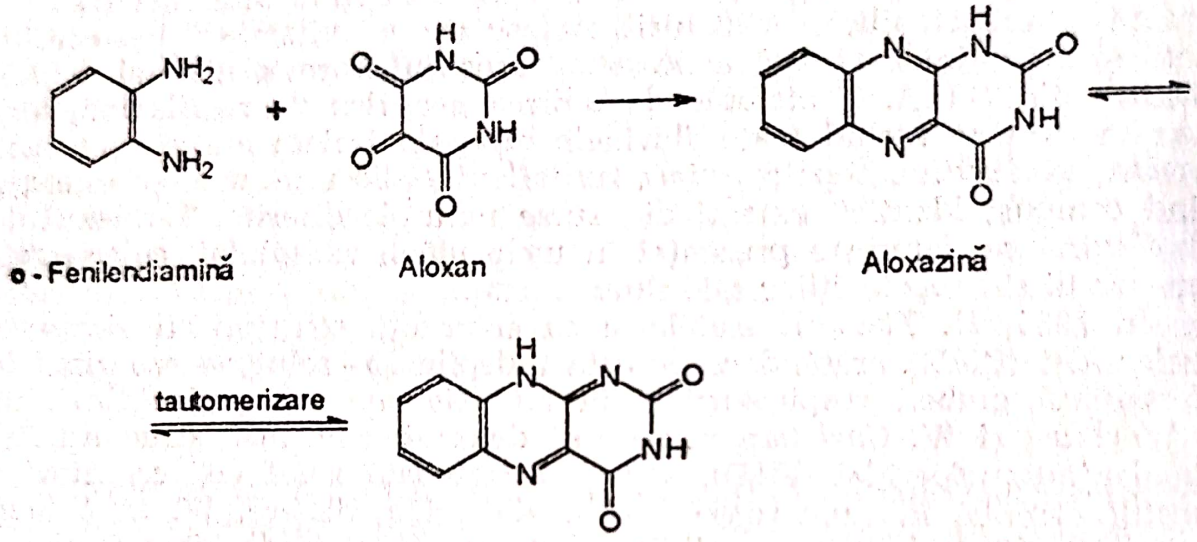


Fig. 8.2. Formarea izoaloxazinei

Sub aspect chimic, riboflavina este un derivat al izoaloxazinei, având ca substituenți două grupări metil la C—6 și C—7, iar la N—9 un ribitil. Nucleul izoaloxazinic are o structură triciclică, fiind format dintr-un ciclu benzenic (I), cu 2 metili substituiți la C—6 și C—7, un heterociclu hexagonal (III), care conține două grupări cetonice la C—2 și C—4 și doi heteroatomi de azot în pozițiile N—1 și N—3, precum și un heterociclu hexagonal central (II), format prin unirea ciclurilor I și III, prin intermediul atomilor de azot N—9 și N—10. Nucleul izoaloxazinic este format astfel din trei cicluri condensate dintre care două (II și III) sunt heterocicluri cu azot, iar unul (I) este homociclu benzenic.

Nucleul izoaloxazinic determină culoarea galben-verzuie și fluorescentă a riboflavinei, la un pH cuprins între valorile 3—9. Substituirea hidrogenului de la N—3 determină dispariția fluorescenței fapt ce explică de ce unele flavinenzime nu au fluorescență, deoarece H de la N—3 este substituit prin legarea proteinelor de coenzime. D-ribitilul imprimă riboflavinei solubilitatea în apă, stabilitate, activitate optică și capacitatea de esterificare cu acidul fosforic, pentru formarea coenzi-

melor active (FMN, FAD). Prin înlocuirea H_3PO_4 cu H_2SO_4 se obține riboflavinmonosulfatul, care reprezintă o antiriboflavină. Înlocuirea D-ribitilului cu enantiomerul L, formează un compus inactiv pe șobolani, iar înlocuirea D-ribitilului cu galactil (galactoflavina) formează o antivitamină. Derivatul cu D-aribitil prezintă activitate vitaminică mai scăzută la microorganisme și se comportă ca antivitamină la șobolan. Prin eliminarea grupărilor hidroxilice de la C—3', C—4' și C—5' a ribitolului se formează o antivitamină B_2.

Suprimarea unui din metilii de la C—6 sau C—7 duce la formarea unor izoriboflavine, care au acțiune antivitaminică la șobolani și unele microorganisme. Efecte similare au și 6,7-dietil-riboflavina și 6-metil-7-amino-izoriboflavina. Prin înlocuirea unui metil cu clor sau brom se obțin compuși cu acțiune antagonică pentru *Lactobacillus casei, Staphilococus aureus, S. plantarum, Bacterium lactis acidi, Eremothecium ashbyi* etc., fără a afecta însă producerea de riboflavină (BEDELEANU, 1985).

Pe cale industrială vitamina B_2 se obține din 1,2-dimetil-4-amino-5-(D-1'-ribitilamino)-benzen și aloxan (fig. 8.3), precum și din aloxan, o-xilen și riboză, folosite ca materii prime.

Pe cale experimentală, prin folosirea unor atomi marcați incorporați în molecula glicocolului, a acidului formic și a acetil-CoA s-a remarcat participarea acestor substanțe la biosinteza riboflavinei în unele bacterii (*Lactobacillus casei, Ashbya gossipii* etc.), crescute pe medii nutritive.

Pe cale industrială, riboflavina se poate obține și prin fermentarea zerului sau a laptelui smântânit cu *Clostridium acetobutylicum, Candida guillermondia, C. tropicalis* etc., obținându-se între 50—60 mg riboflavină dintr-un litru de lichid fermentativ, cu condiția ca sursa de carbon utilizată că fie glucoza. În cantități mari, în scopuri comerciale, riboflavina se obține și din culturile ciupercii *Ermothecium ashbyi*, unde vitamina apare în mediul de cultură chiar sub formă de cristale. Bazele purinice (adenină, guanină, xantină, hipoxantină) și aminoacizii serina și treonina, stimulează biosinteza riboflavinei. Este posibil ca biosinteza riboflavinei în diferite organisme să se formeze din două

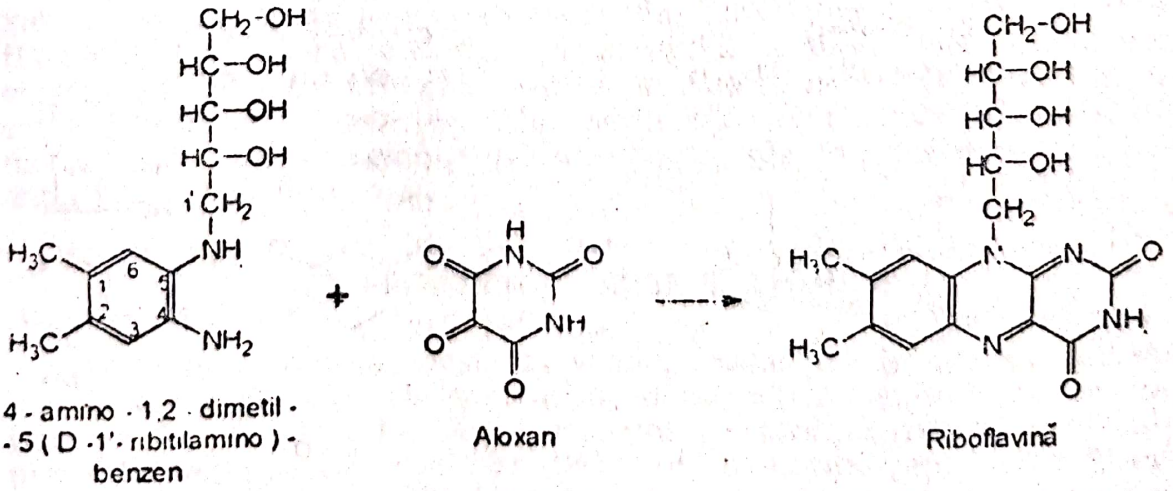


Fig. 8.3. Sinteza riboflavinei

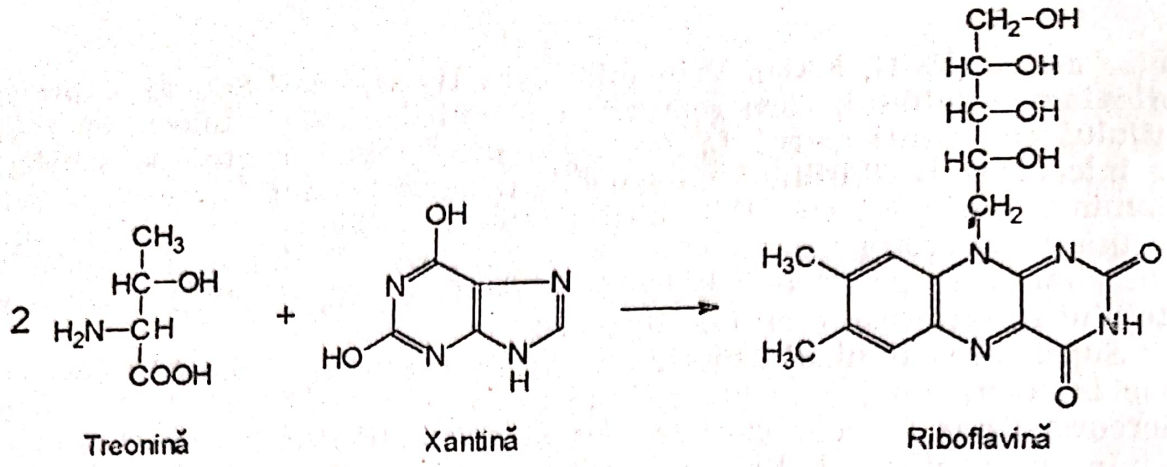


Fig. 8.4. Biosinteza riboflavinei

molecule de treonină și una de xantină (fig. 8.4). Biosinteza riboflavinei este stimulată și de acidul gluconic, arabinoză, heptuloză, serină, tirozină, acizii glutamic și aspartic și mai puțin de nucleozidele și nucleotidele purinice.

Prin esterificarea riboflavinei cu acid fosforic sub acțiunea flavokinazei, a ionilor de magneziu și a ADP-ului se obține *flavinmononucleotida* (FMN), iar prin tratarea FMN cu ATP sub acțiunea flavinadeninpirofosforilazei și a ionilor de Mg^{2+} se obține *flavinadenindinucleotida* (FAD) și acid pirofosforic, conform reacțiilor:

$$\text{Riboflavină} + \text{ATP} \xrightarrow[\text{Flavokinază}]{Mg^{2+}} \text{FMN} + \text{ADP}$$

$$\text{FMN} + \text{ATP} \xrightarrow[\text{Flavinadenin-pirofosforilază}]{Mg^{2+}} \text{FAD} + \text{P—P}$$

Flavinadeninmononucleotida (FMN) și flavinadenindinucleotida (FAD) (fig. 8.5), reprezintă formele active ale riboflavinei în organism întrucât îndeplinesc rolul de coenzime în diferite enzime flavinice, care au

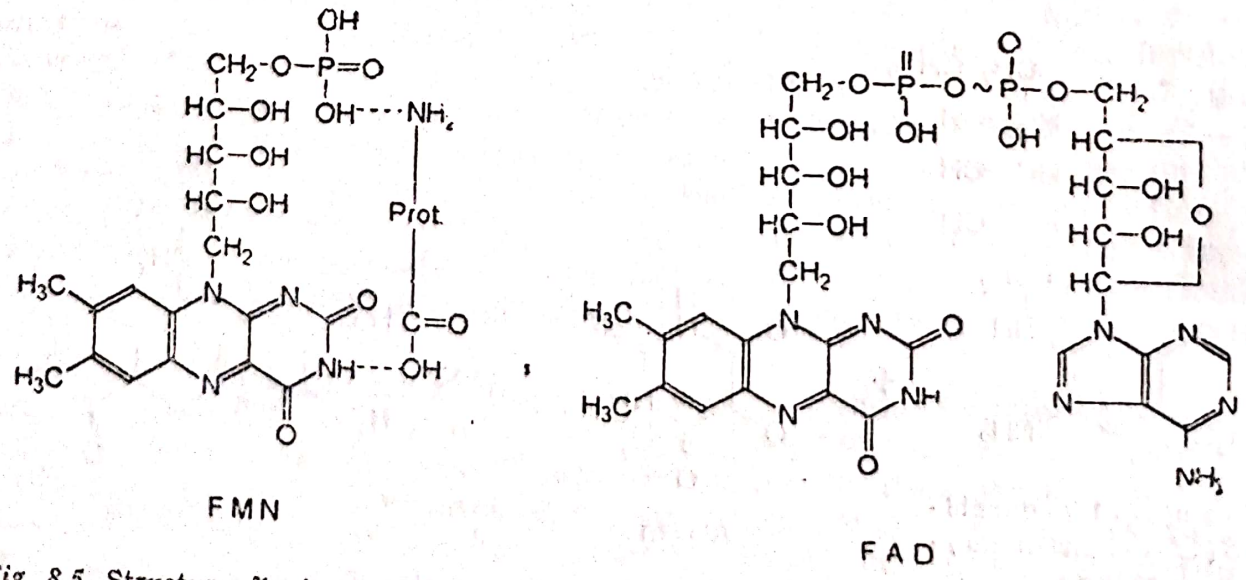


Fig. 8.5. Structura flavinadeninmononucleotidei (FMN) și a flavinadenindinucleotidei (FAD)

un rol esențial în metabolismul glucidelor, acizilor grași, aminoacizilor și a altor substanțe.

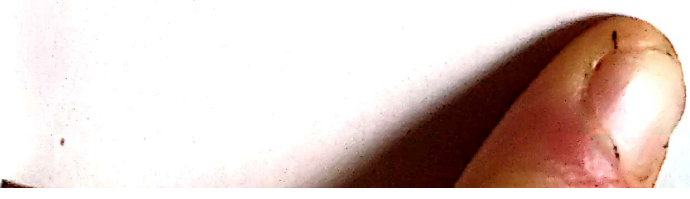
La majoritatea enzimelor flavinice, legarea coenzimelor FMN și FAD de partea proteică se face prin intermediul atomilor NH din poziția 3 (NH/3) cu gruparea carboxilică liberă din molecula proteică, iar gruparea aminică (NH_2) din proteină se leagă de un rest fosforic al coenzimelor. Legăturile dintre coenzime și apoenzime sunt destul de puternice deși nu sunt legături covalente. La succindehidrogenază se stabilește o legătură covalentă prin intermediul metilenului (—CH_2—) din C—7 cu atomul N-imidazolic din histidină, sau cu atomul de sulf din cisteină în cazul monoaminooxidazelor (MAO). Unele flavinenzime numite metaloflavoenzime incorporează în molecula lor și oligoelemente cu valență variabilă (Fe, Mn, Mo, Cu, Zn etc.) drept cofactori suplimentari care contribuie la transportul electronilor și la legarea enzimei de substrat. Astfel, xantinoxidaza conține FAD, atomi de Mo și Fe, D-lacticodehidrogenaza conține FAD și 3 atomi de Zn, succinicodehidrogenaza conține FAD și 4 atomi de Fe, NADH-citocrom-b_5-reductaza conține FAD și 2 atomi de Mg, iar butiril-CoA-dehidrogenaza conține FAD și un atom de Cu.

Citocrom-C-reductaza conține FMN și atomi de fier. Fermentul galben respirator conține FMN.

FMN nu este o mononucleotidă propriu-zisă deoarece în locul ribozei conține ribitol, iar în locul unor baze purinice sau pirimidinice conțin nucleul izoaloxizinic. FMN reprezintă de fapt monofosfatul vitaminei B_2. La fel și în molecula FAD-ului se află ribitolul, în locul ribozei, legat de nucleul izoaloxizinic, dar datorită structurii similare cu nucleotidele se păstrează și în prezent denumirea de FMN și respectiv FAD. Toate coenzimele flavinice conțin riboflavine, au culoare galben-verzuie, prezintă fluorescență și se descompun sub acțiunea luminii. Formarea esterilor fosforici ai riboflavinei (FMN, FAD) pe cale enzimatică are loc în interiorul celulelor, în special la nivelul intestinului subțire, în ficat, rinichi, eritrocite etc., dar acest proces nu se realizează în lichidele biologice și în plasmă. Pe cale de sinteză s-au obținut numeroși izomeri structurali ai riboflavinei dintre care numai 6,7-dimetil-9-(L-1'-arabitil)-izoaloxazina; 7-metil-9-(D-1'-ribitil)-izoaloxazina; 6-metil-9 (D-1'-ribitil)-izoalaxazina și 6-etil-1-metil-9-(D-1'-ribitil)-izoaloxazina posedă aproximativ jumătate din activitatea biologică a riboflavinei. Toți acești compuși, cu excepția araboflavinei stimulează creșterea la *Streptobacterium casei* și la *Bacterium lactis acidi*. Din ficatul de șobolan și din miocardul uman s-a izolat lixoflavina (6-7-dimetil-9(D-1'-lixidil)-izoaloxazina, care poate înlocui riboflavina în nutriția la *Lactobacillus casei*.

8.3. PROPRIETĂȚI FIZICE ȘI CHIMICE

Riboflavina este o substanță solidă, cristalină, de culoare galbenă sau galben-portocalie, cu gust amar, optic activă, cu unghiul de rotație (—)70°. Prezintă trei forme polimorfe cristaline, cu puncte de topire diferite, cuprinse între 280—290°C, cu descompunere. La 240°C începe să se înnegrească. Riboflavina cristalizată sub formă aciculară (ace



Scanned with OKEN Scanner

fine) are punctul de topire la 290°C, iar cea cristalizată sub formă de plăcuțe (lamele) se topește la 280°C. În mediu acid riboflavina prezintă o activitate optică levogiră mult mai intensă decât în mediu neutru sau bazic, având unghiul de rotație a luminii polarizate între (—)110° și (—)130°. Culoarea galbenă este determinată de nucleul izoaloxazinic, iar în soluție prezintă fluorescență verzuie, care este maximă în mediu de piridină, cu absorbție la 530—560 nm.

Riboflavina este ușor solubilă în soluții alcaline, piridină, acid acetic, alcool amilic, ciclohexanol, fenol și practic insolubilă în cloroform, benzen, acetonă, eter de petrol, etanol. În apă este puțin solubilă, dizolvându-se 10—13 mg/100 ml apă la 25°C și 250 mg la 100°C. Esterii fosforici (FMN, FAD) au o solubilitate mai mare în apă decât riboflavina, fiind insolubili în etanol și eter.

Riboflavina are un caracter amfoter, cu punctul izoelectric la pH 6. În soluție prezintă un spectru de absorbție caracteristic, cu maxime de absorbție la 445, 372, 369 și 225 nm. Este rezistentă față de acizi și agenții oxidanți mai slabi, dar se degradează foarte ușor sub acțiunea luminii, în special a radiațiilor ultraviolete. În prezența luminii și în mediu alcalin, riboflavina se transformă în *lumiflavină*, iar în mediu neutru sau acid în *lumicrom*, compuși care nu prezintă activitate vitaminică (fig. 8.6).

Lumicromul este un compus intens fluorescent și conține câte un atom de hidrogen activ la N-1 și N-3, iar lumiflavina numai un atom la N-3. Lumicromul are o fluorescență albastră, iar lumiflavina verzuie. Riboflavina sub formă de FAD nu este influențată de lumină. Lumicromul și lumiflavina sunt solubili în cloroform spre deosebire de riboflavină, fapt ce permite separarea acestor compuși. În cazul unei fotolize intense, în prezența fierului și a oxigenului, riboflavina se degra-

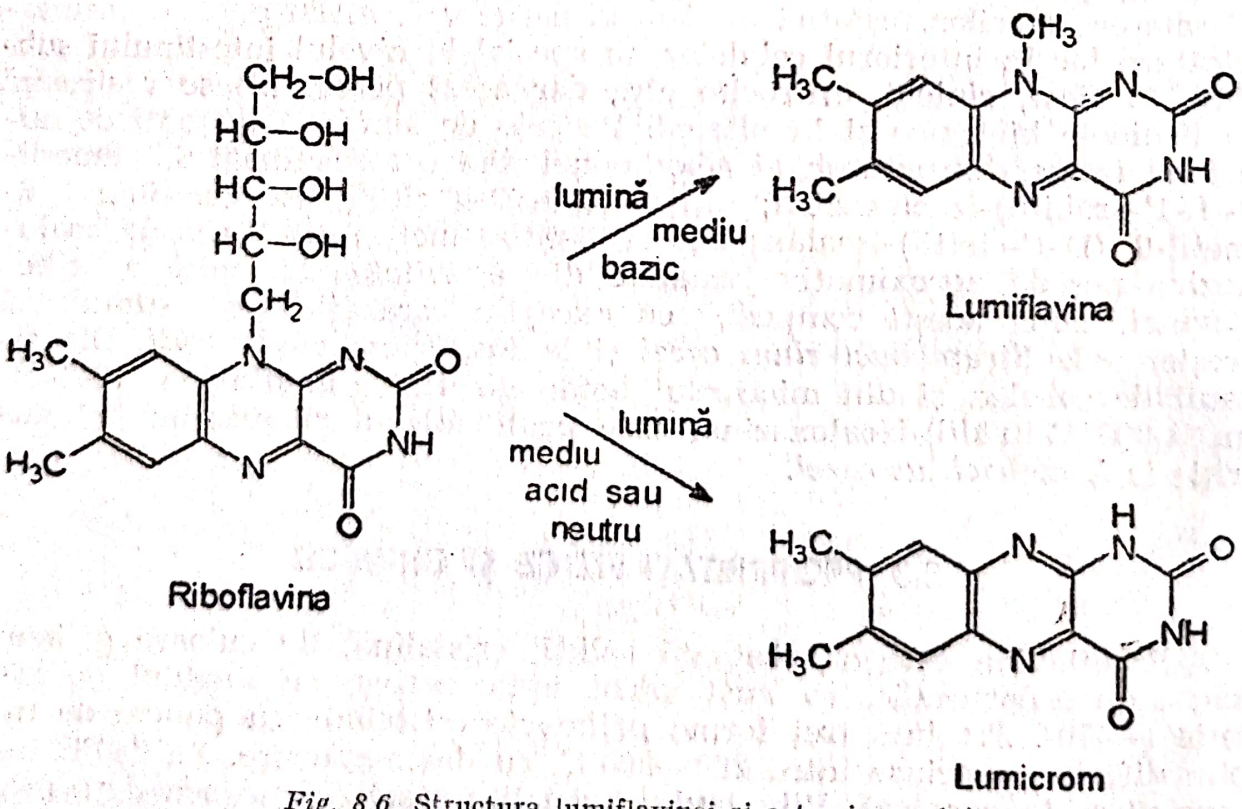


Fig. 8.6. Structura lumiflavinei și a lumicromului

dează în 1, 2-dimetil-4-amino-5-metil-aminobenzen, uree, CO_2, acid formic, acid glicolic etc.

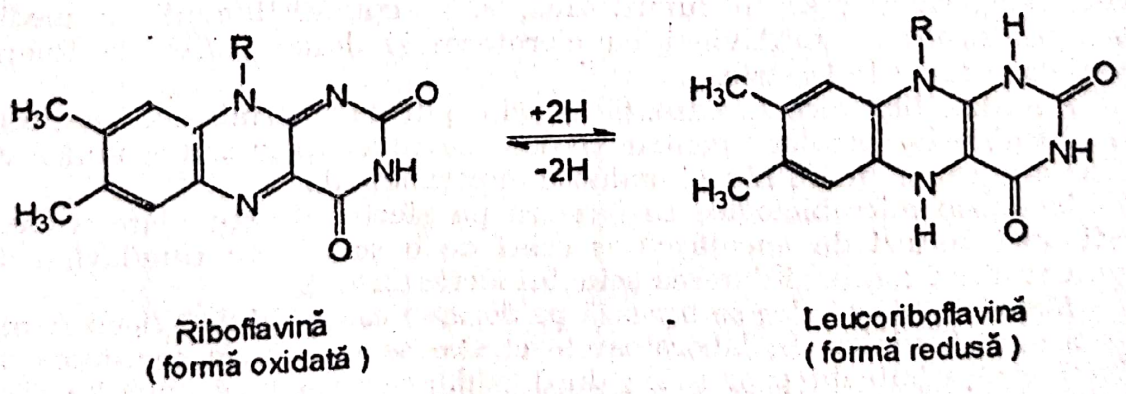
Riboflavina este termostabilă în mediu acid și termolabilă în mediu bazic. Cu cât pH-ul are valori mai mici, stabilitatea riboflavinei este mai mare și invers. La un pH cuprins între 2—5, riboflavina rezistă timp de o oră la 120°C, iar la un pH peste 8,7 pierde jumătate din activitatea vitaminică, la 100°C, timp de o oră.

Riboflavina prezintă proprietăți oxidoreducătoare foarte importante. Are potențial redox negativ (E_0 = — 185 V), fapt ce îi imprimă o mare reactivitate chimică. În mediu acid, riboflavina nu se degradează ireversibil sub acțiunea unor persulfați, a acidului cromic, $KMnO_4$ etc.

Riboflavina este sensibilă la acțiunea reducătorilor, cu ajutorul cărora se transformă reversibil intr-un derivat incolor numit *leucoriboflavină*, care prezintă fluorescență și este ușor reoxidată la riboflavină, chiar și prin agitare la aer.

Datorită trecerii reversibile a riboflavinei din forma oxidată care are o culoare galbenă, la forma redusă (leucoriboflavina) incoloră, se formează în celule unul din cele mai importante sisteme de oxidoreducere, care ia parte la metabolizarea a numeroase substanțe din organismele vegetale și animale (fig. 8.7).

Riboflavina, atât în stare liberă, cât și sub formă de compuși (FMN, FAD etc), poate să treacă reversibil din forma oxidată în forma redusă, fapt ce contribuie la transportul hidrogenului în celule. În ce privește mecanismul care stă la baza acestui sistem de oxidoreducere, s-a stabilit cu atomi marcați că riboflavina fixează doi atomi de hidrogen la atomii de azot N-1 și N-10 din nucleul izoaloxazinic, care sunt foarte reactivi și pot fi cedați cu ușurință unor substanțe oxidante. Prin fixarea celor doi atomi de hidrogen, riboflavina trece din forma oxidată (colorată în galben), în forma redusă (incoloră), datorită întreruperii sistemului cromoforic prin dispariția dublelor legături conjugate de la N-1 și N-10. Acest sistem redox riboflavinic are un rol esențial în procesele de oxidoreducere din celule și țesuturi. Reducerea riboflavinei la leucoriboflavină este de fapt un proces mai complicat, care se realizează în mai multe etape, la care participă radicali liberi de tipul semichinonelor, care formează complexe intermediare colorate cum sunt verdoflavina (verde), cloroflavina (verde) și rodoflavina (roșu). Aceste complexe semichinonice s-au pus în evidență prin spectre de absorbție, fluorescență, rezonanță paramagnetică, dar nu au o structură stabilă,



Riboflavină (formă oxidată)

Leucoriboflavină (formă redusă)

Fig. 8.7. Sistem de oxidoreducere

Scanned with OKEN Scanner

mai ales în complexele enzimă — substrat, fapt pentru care nu prezintă importanță deosebită.

Trecerea leucoriboflavinei în riboflavină se realizează în prezența oxigenului sau a unor acceptori de hidrogen. Leucoribiflavina este ușor axidotă atât de citocromul c cât și de fericianura de potasiu. Riboflavina formează cu metalele grele compuși chelatici, iar FMN formează compuși de adiție cu fenoli, triptofan, baze purinice, serotonină, cloromicetină etc. Este ușor adsorbită de alumină, cărbune, silicagel etc., iar eluarea de pe coloane adsorbante se face cu acid acetic diluat sau cu piridină încălzită.

8.4. METODE DE IDENTIFICARE ȘI DOZARE

Riboflavina se poate identifica și determnia cantitativ cu ajutorul unor metode fizice, biologice, microbiologice și biochimice.

Dintre metodele fizice sunt frecvent utilizate metodele spectrofotometrice, atât pentru identificarea, cât și pentru dozarea riboflavinei și a compușilor săi întrucât sunt mai simple și mai rapid de efectuat. Ele se bazează pe înregistrarea spectrului de absorbție care prezintă maxime de absorbție la 445, 372, 369 și 225 nm, caracteristice riboflavinei. Se folosesc de asemenea metode fluorimetrice pentru determinarea spectrului de fluorescență care prezintă un maxim la 365 nm, la pH 6,0.

Prin utilizarea metodelor cromatografice pe coloană, în strat subțire sau pe hârtie se poate realiza separarea riboflavinei de FMN și FAD și dozarea individuală a acestora. Întrucât riboflavina prezintă o fluorescență intensă în lumină albastră, la pH 6—7, această proprietate este folosită pentru dozarea prin fluorimetria fotoelectrică, metodă care elimină factorii subiectivi ai cercetătorului. Eficiența metodelor fizice crește dacă din mediul (soluția) în care se află riboflavina sunt îndepărtați clorul, cianuri, sulfiți, nitriți, sulfocianați, pigmenți fluorescenți etc., care determină o „stingere" a fluorescenței.

Prin tratarea riboflavinei cu sulfit de sodiu se obține un compus lipsit de fluorescență, care însă prin simplă agitare la aer se retransformă în riboflavină fluorescentă.

Se folosesc și metode polarimetrice, dar ele sunt eficiente și reproductibile numai când se folosesc soluții cu riboflavină pură.

Din lichide biologice (urină, ser, sânge etc.), riboflavina se dozează prin transformarea sa în lumiflavină, sub acțiunea luminii în mediu bazic, extragerea lumiflavinei cu cloroform și dozarea acesteia fluorimetric sau fotocolorimetric.

Metodele biologice se bazează în principiu pe determinarea cantității de vitamină B_2 necesară pentru vindecarea șobolanilor sau a puilor de găină aflați în stare de hipovitaminoză experimentală.

Metodele microbiologice se bazează pe efectul de stimulare a creșterii unei culturi de *Lactobacillus casei* de o soluție de riboflavină de concentrație 5 ng/ml și dozarea acidului lactic format.

Metodele biochimice se bazează pe dozarea cantității de oxigen fixată de enzime flavinice. În laboratoarele clinice se urmărește cantitatea de riboflavină eliminată prin urină după administrarea unei anumite cantități de vitamină în hrană, precum și dispariția unor simptome caren-

Scanned with OKEN Scanner

ţiale după administrarea a 10 mg de riboflavină per os. Un alt test clinic constă în saturarea tisulară cu riboflavină, care constă în administrarea orală a unei doze de riboflavină în exces şi determinarea conţinutului acesteia din sânge şi urină la diferite intervale de timp.

Unitatea Internaţională (UI) propusă de V. EULER, pentru vitamina B_2, corespunde activităţii a 5 μg de riboflavină pură, care asigură creşterea puilor de şobolan cu 1 g/zi. Un gram de riboflavină corespunde cu 1,37 g de FMN şi cu 400 000 unităţi B.S. (Bourquin-Sherman). O unitate B.S. este egală cu 2—3 μg de riboflavină, fiind mai mică decât Unitatea Internaţională.

8.5. RĂSPÂNDIRE ÎN NATURĂ

Vitamina B_2 este larg răspândită în natură fiind prezentă în toate celulele organismelor vegetale, animale, precum şi în microorganisme. Conţinutul vitaminei B_2 din ţesuturile verzi este relativ ridicat, variind de la 2,5 la 25 μg/g. Cele mai bogate produse horticole în vitamina B_2 sunt migdalele, alunele, ciupercile, pătrunjelul, ţelina (tabelul 8.1). La plantele superioare, vitamina B_2 se găseşte în cantitate mai mare în plantule, seminţe în stare de germinaţie, polen, frunze tinere, în general în ţesuturile meristematice. Plantele deşi nu conţin cantităţi mari de riboflavină, au un rol important în aprovizionarea organismelor ani-

Tabelul 8.1

Conţinutul vitaminei B_2 în diferite produse vegetale

Produs	Vitamina B_2 μg/100 g
Concentrat de drojdii	12 000—20 000
Drojdie de panificaţie	3 700
Drojdie de bere	1 800—3 000
Germeni de grâu	300—1 000
Malţ de orz	210
Porumb	100
Grâu	80—90
Orz	85
Conopidă	50—100
Fasole	63
Pastă de tomate	50—70
Tomate	35—40
Pătrunjel	70
Spanac	57
Morcovi	60
Caise	57
Varză albă	50
Pere	40
Struguri	40
Ceapă	20—50
Mere	6—30
Mazăre boabe	9
Cartofi	10
Bere	29

Scanned with OKEN Scanner

male cu această vitamină datorită volumului mare al produselor vegetale din hrana omului și a animalelor. Cantități mari de vitamina B_2 conțin bacteriile anaerobe și drojdiile cu mare putere de fermentare, în medie 3 mg/100 g. La mamifere ficatul, rinichiul, inima, splina, creierul sunt organele în care riboflavina se găsește în cantitate mai mare (1—3 mg%). Cantități însemnate de vitamina B_2 se găsesc de asemenea în ficatul peștilor, retina ochilor, glandele lacrimare și chiar lacrimile. Conținutul riboflavinei din corneea și cristalinul ochilor este de 180 și respectiv 300 µg/100 g, iar concentrația în lichidul lacrimal este de 14 µg/100 ml. În sânge conținutul riboflavinei are valori mai mici dar relativ constante, fiind cuprinse la oamenii adulți între 15—20 µg/100 ml, iar la copii între 3—4 µg/100 ml. Aproximativ 25% din riboflavină se găsește în stare liberă în plasma sanguină, iar restul sub formă de FAD. Drojdiile conțin cantități mari de FMN, care variază între 2 și 5 mg/100 g S.U., în funcție de varietate. *Bacillus delbruckii* conține 1,15 mg/100 g S.U. Unele bacterii au nevoie de riboflavină pentru creșterea și dezvoltarea lor (*Lactobacillus casei, Streptococcus haemoliticus etc.*). În plante, care reprezintă o sursă însemnată de vitamină B_2 pentru om și animale, conținutul acestei vitamine este mai mic decât în unele alimente de origine animală (lapte, carne, ouă, pește). Animalele hrănite cu făn au mai puțină riboflavină în lapte decât cele hrănite cu iarbă. Laptele proaspăt de vacă conține 135—300 µg/100 ml, colostrul 400—600 µg/100 ml, laptele praf 1 600 µg/100 g, iar laptele uman 16—52 µg/100 ml. Untul este sărac în riboflavină (12 µg/100 g). Oul întreg conține 250—440 µg/100 g, albușul 230, iar gălbenușul 285—520 µg/100 g.

În timpul preparării alimentelor nu se produce o degradare accentuată a vitaminei B_2, care este termostabilă în mediu acid. Prin fierberea alimentelor cu apă se pierde până la 20% din conținutul riboflavinei dacă se aruncă apa și nu intră în alimente. Coacerea provoacă pierderi până la 27%, iar frigul până la 15% din riboflavină. Produsele alimentare neambalate, expuse la lumină, pierd până la 50% din conținutul riboflavinei, de aceea se recomandă păstrarea laptelui la întuneric, în oale sau sticle închise. Riboflavina din laptele ținut în sticle transparente, expuse la lumină solară timp de 2 ore, se degradează în proporție de 85%. Sterilizarea alimentelor prin iradiere sau prin tratare cu etilen oxid, cauzează degradări mari de riboflavină.

Vitamina B_2 este biosintetizată în cantitate mai mare de plante superioare, drojdii, bacterii anaerobe fermentative și de unele ciuperci. Omul și animalele nu pot biosintetiza riboflavina pe care o procură din hrană. Cantități însemnate de riboflavină produc unele microorganisme din prestomacele ierbivorelor și din flora intestinală cum sunt: *Escherichia coli, Bacillus proteus vulgaris, B. lactis aerogenes B. mesentericus, B. vulgatus* etc.

Dintre bacteriile intestinale care nu sintetizează riboflavina fac parte *Streptococcus mastiditis, S. faecium, S. faecalis, S. lactis, Clostridium tetani, Bacterium bifidum, Leuconostoc mesenteroides* etc.

În organism riboflavina apare atât sub formă liberă cât și sub formă de compuși, în mod deosebit sub formă de FMN și FAD.

În retină, lapte, urină, în general în lichidele biologice, riboflavina apare în stare liberă, iar în țesuturi riboflavina se găsește predominant sub formă de FAD, FMN, iar o cantitate mică și în stare liberă. Com-

Scanned with OKEN Scanner

pușii FAD și FMN se găsesc în mare parte legați de proteine cu care formează enzimele flavinice. În laptele de iapă și de femeie, riboflavina se găsește în cantitate mare sub formă de FAD, iar în laptele de vacă, oaie, capră, iepure, semnalându-se cantități foarte mici de FAD.

În organismele mamiferelor vitamina B_2 în stare liberă se găsește în proporție de aproximativ 15—20%, iar sub formă de FMN și FAD în proporție de 80—85%. La unele animale și microorganisme FAD reprezintă 70—90% din compușii riboflavinei.

8.6. ABSORBȚIE, ELIMINARE ȘI NECESITĂȚI

Riboflavina provenită prin hidroliza alimentelor sau a falvinenzimelor în stomac, se absoarbe în organism la nivelul intestinului subțire (partea superioară), atât în stare liberă, cât și sub formă de ester monofosforic. Fosforilarea riboflavinei se realizează la nivelul mucoasei intestinale, sub acțiunea unei flavokinaze și a ATP-ului, ca donator de grupări fosfat. Dereglarea mucoasei intestinale și inhibarea fosforilării cu acid monoiod acetic, împiedică formarea FMN-ului la nivelul intestinului. Sărurile biliare și acidul clorhidric favorizează procesul de absorbție a riboflavinei. Riboflavina din produsele animale este mai ușor absorbită decât din produsele vegetale. După absorbție, riboflavina și FMN sunt transportate cu ajutorul unor albumine serice la ficat; unde are loc formarea FAD-ului, o altă coenzimă importantă în procesele de oxidoreducere. Prin combinarea FMN și FAD cu proteine specifice, se formează flavinenzimele corespunzătoare. Timpul de înjumătățire a riboflavinei în ficatul de șobolan este de 5,5 zile. Riboflavina depozitată, legată de proteine, are o fluorescență roșie.

Riboflavina, FMN, dar mai ales FAD sunt răspândite în toate țesuturile și se depozitează în cantități foarte mici. Ficatul, care este principalul organ de depozit, conține aproximativ o treime din totalul compușilor riboflavinici existenți în organism. Conținutul riboflavinei din plasma sanguină, la o absorbție normală, are valori optime în jur de 30—40 μg/litru. O cantitate mare de riboflavină în stare liberă se găsește în retină, a cărei funcție încă nu se cunoaște pe deplin.

Sângele uman conține aproximativ 3—4 μg/100 ml din care 0,84 în stare liberă, iar 2,32 μg/100 ml sub formă de compuși. Conținutul riboflavinei din eritrocite reflectă destul de bine aportul alimentar al acestei vitamine. Astfel, după ingerarea a 0,5 mg riboflavină pe zi, aceasta se regăsește în eritrocite în concentrație de 10—13 μg/100 ml de riboflavină, conținutul acesteia în eritrocite va fi de 20—27 μg/100 ml. Ficatul uman, conține 25—33 μg/g compuși riboflavinici, dar conținutul acestora scade cu îmbătrânirea și în stări carențiale (1,15 μg/g). După unele rapoarte, conținutul aproximativ al riboflavinei din diferite țesuturi și organe la om, exprimat în μg/g se prezintă astfel: în inimă 8,3; ficat 16; rinichi 20; leucocite 2,27—2,93 μg/l; eritrocite 160—262 μg/l; ser 20—37; iar în sângele total 49—304 μg/l.

Riboflavina este excretată în principal prin urină și îi imprimă acesteia o culoare gălbuie. Când cantitatea de riboflavină absolută este egală cu cea necesară, în 24 de ore se elmină între 9—30%, din ribo-

Scanned with OKEN Scanner

flavina ingerată, o parte în stare liberă, iar o parte sub formă de FMN și sub forma unor compuși de degradare. O excreție de 20—30 µg/oră de riboflavină, reflectă o stare normală a organismului, iar valori sub 10 µg/oră, indică stări de carență. Excreția de riboflavină la copii este proporțional (kg/corp) mai mare decât la adulți. Prin transpirație, riboflavina se elimină aproximativ 8 µg/oră. O parte din riboflavina eliminată prin fecale provine din biosinteza florei intestinale și partea neabsorbită la nivelul intestinului subțire. O cantitate foarte mică de riboflavină se elimină și prin bilă. În stări de avitaminoză, crește cantitatea de riboflavină eliminată prin urină. Excreția riboflavinei prin urină se poate aprecia și după cantitatea de creatinină eliminată (µg riboflavină/g creatinină). Un conținut mai mic de 27 µg riboflavină per 1 g de creatinină indică o stare de hipovitaminoză. Un conținut de 27 la 79 µg/g creatinină indică un conținut scăzut, iar numai nivelele de 80 µg și mai mari de riboflavină/g de creatinină reflectă o stare normală. Excreția prin urină a riboflavinei depinde și de activitatea glandei tiroide. Hipertiroidismul la șobolan mărește excreția riboflavinei.

Necesarul de vitamina B_2 se asigură cu ușurință prin consumul zilnic de produse vegetale, lapte, ouă, carne, produse lactate, pește etc. Necesarul de vitamină B_2 pentru omul adult este în medie de 1,6 mg/zi, care se acoperă atât din aport exterior, cât și biosinteză de către flora intestinală.

Necesitățile sugarului în vitamina B_2 sunt de 0,6 mg/zi, la gravide de 2,5 mg/zi, iar la femeile care alăptează de 6 mg/zi din care 10—20% trece în lapte. În cazuri de avitaminoză experimentală la om, după administrarea de riboflavină, timp de 1—2 zile, dispare senzația de „nisip în ochi", fotofobia, apoi afecțiunile pielii, leziunile bucale, iar vindecarea completă se realizează abia după 1—2 luni de tratament. Pe cale experimentală, cu oameni voluntari, s-a stabilit că administrarea a 0,55 mg/zi vitamina B_2 în organism determină apariția hipovitaminozei după 90 de zile. Prin studii efectuate în 38 de țări s-a stabilit că 0,6 mg de riboflavine sunt necesare pentru metabolizarea alimentelor care produc 1 000 kcal. După 1989 s-a stabilit că pentru oamenii sănătoși, cu un regim alimentar echilibrat, pentru femei sunt necesare 1,2—1,3 mg/zi, iar pentru bărbați între 1,4—1,8 mg/zi. O cantitate suplimentară de 0,3 mg/zi este necesară femeilor gravide și de 0,5 mg/zi pentru femeile care alăptează timp de 6 luni și un coeficient de siguranță în ce privește absorbția de 0,4 mg/zi.

Necesitățile zilnice în riboflavină ale oamenilor depind în general de compoziția hranei. O alimentație bogată în proteine și grăsimi necesită mai multă riboflavină decât în cazul predominării glucidelor, a produselor vegetale în general. Șobolanii au nevoie de 3 mg/zi riboflavină pentru o dezvoltare normală, iar puii de găină de 3,6 mg/zi. Găinile ouătoare necesită 4 mg riboflavină/kg corp.

8.7. ROL ȘI ACTIVITATE BIOLOGICĂ

Riboflavina are un rol însemnat în organismele vegetale și animale atât în stare liberă cât și sub formă de FMN și FAD, care îndeplinesc rolul de coenzime în numeroase enzime flavinice, ce au un rol esențial

Scanned with OKEN Scanner

în metabolizarea glucidelor, lipidelor, protidelor și a altor substanțe, precum și în antrenarea unor elemente minerale cu valență variabilă în activități enzimatice, cu rol de cofactori adiționali.

Riboflavina în stare liberă este un factor de creștere pentru organismele tinere și pentru numeroase microorganisme. Ea stimulează secreția acidului clorhidric în stomac. Creșterea organismelor tinere este stimulată de către riboflavinmonofosfat (FMN), deoarece inhibarea fosforilării cu acid monoiodacetic determină oprirea creșterii organismelor animale. Prin administrarea de FMN se anulează oprirea creșterii animalelor.

Riboflavina participă alături de vitamina A în procesul vederii, fapt ce justifică conținutul ridicat al acestei vitamine în retină. Se pare că riboflavina transformă radiațiile cu lungime de undă scurtă în radiații cu lungime de undă mare, care devin astfel perceptibile. Sub acțiunea luminii, riboflavina se transformă într-un „fotocompus" care participă la stimularea nervului optic. Acest fotocompus a cărui structură încă nu se cunoaște, în prezența oxigenului se retransformă în riboflavină. Riboflavina din retină intervine mai eficace în vederea crepusculară, unde participă și prin activitatea sa fluorescentă. Ochiul uman are o sensibilitate maximă pentru lumina verzuie. În procesul vederii, riboflavina poate acționa și singură acolo unde vitamina A nu este eficace. Riboflavina are un rol însemnat în procesele de bioluminiscență la licurici. Fosforescența unor viermi este produsă de riboflavină, legată de o proteină specifică.

Riboflavina în stare liberă, prin transformarea sa reversibilă în leucoriboflavină, pe baza fixării de hidrogen la N-1 și N-10, contribuie la transportul hidrogenului în organism pe cale neenzimatică.

Rolul cel mai important al riboflavinei constă în participarea sa sub formă de FMN și FAD în formarea enzimelor flavinice, care au un rol fundamental în oxidările celulare. FMN și FAD reprezintă formele active ale riboflavinei în organism. Enzimele flavinice catalizează numeroase reacții din metabolismul intermediar care diferă atât prin natura substratului asupra cărora acționează enzimele, cât și a acceptorilor de hidrogen și electroni. Cele mai importante reacții catalizate de flavinenzime sunt cele referitoare la metabolizarea glucidelor, dezaminarea oxidativă a aminoacizilor, oxidanea hidroxiacizilor și a aldehidelor, dehidrogenarea acizilor grași, transportul hidrogenului de la NADH și NADPH la CoQ și la citocromul c.

În stări carențiale ale riboflavinei, este puternic perturbat metabolismul aminoacizilor și al substanțelor proteice. Se produce o reducere accentuată a biosintezei acestora și crește eliminarea aminoacizilor prin urină. Se produce de asemenea o reducere a activității glutationreductazei din eritrocite. În deficiența proteică din organism este perturbată formarea enzimelor flavinice și astfel crește eliminarea prin urină a compușilor flavinici.

FMN este component al fermentului galben respirator (fermentul Warburg-Christian), citocromreductazei, lacticodehidrogenazei, NADPH-oxidoreductazei etc. El se formează în cantitate mai mare la nivelul intestinului subțire din riboflavină, sub acțiunea flavokinazei, a ionilor de magneziu și a ATP-ului ca donator de energie și de fosfat. În cantitate mică FMN se poate sintetiza și în ficat, rinichi, sânge și alte or-

Scanned with OKEN Scanner

gane și țesuturi. Sub formă de FAD, riboflavina intră în structura unor enzime ca D-aminoacidoxidaze, xantinoxidaze, glicinoxidaze, butiril-CoA-dehidrogenaza, glutationreductaza, D-glucozooxidaza, salicilanhidro-xilaza, nitrat și nitrit reductaze etc. FAD se formează din FMN și ATP sub acțiunea flavinadeninpirofosforilazei și a ionilor de magneziu în ficat, rinichi, sânge, retină și în alte țesuturi și organe. FAD reprezintă forma principală de depozit a riboflavinei din interiorul celulelor. Așa după cum s-a menționat, FMN și FAD au un rol esențial în metabolizarea glucidelor, lipidelor, protidelor și a altor compuși, asigurând totodată transportul enzimatic al hidrogenului și a electronilor în respirația tisulară. FAD preia hidrogenul de la enzime anaerobe, care conțin $NADH+H^+$ sau $NADPH+H^+$ și îl cedează oxigenului cu formarea de apă oxigenată sau îl cedează CoQ (ubichinonelor) care îl va transforma în ioni de hidrogen. Electronii vor fi cedați oxigenului, prin intermediul mai multor citocromi. Din ionii de hidrogen și cei de oxigen se va forma apa ca produs final al respirației tisulare. Riboflavina stimulează absorbția glucidelor în intestin pe calea fosforilării. Glucoza și galactoza sunt absorbite rapid în organism în prezența riboflavinei. Inhibitorii fosforilării împiedică absorbția intestinală a glucidelor.

Vitamina B_2 este un constituent celular esențial, iar sub forme active (FMN, DFAD), are un rol covârșitor în procesele de respirație celulară, în special prin reacțiile de dehidrogenare și de transportare a hidrogenului. La mamifere, tiroxina și triodtironina stimulează biosinteza FMN și FAD, iar preparatele anticolinice stimulează absorbția riboflavinei. Riboflavina are un efect stimulator asupra creșterii plantelor superioare, mai cu seamă în condiții de obscuritate, în timp ce la soare efectul este invers, de inhibare. Conținutul riboflavinei din semințele cerealelor și leguminoaselor crește în mod simțitor în timpul germinării acestora de la 0,6—2 μg/g S.U. la 2—12,4 μg/g. Extractele din plantule, similar celor din drojdii, aplicate în mediile de cultură stimulează formarea de FMN. Riboflavina stimulează biosinteza antocianilor la întuneric. După unele calcule, o moleculă de riboflavină stimulează biosinteza a 30—60 molecule de antociani.

8.8. HIPOVITAMINOZE ȘI HIPERVITAMINOZE

Atât la om cât și la animale, stările de hipovitaminoză B_2 apar foarte rar întrucât aportul alimentar și activitatea florei intestinale asigură necesarul de vitamină. În cazuri experimentale, sau datorită unor afecțiuni digestive, gastrice, hepatice, care micșorează substanțial absorbția riboflavinei la nivelul intestinului subțire, în cazuri de hipoclorhidrie, alterarea florei intestinale, consum mare de antibiotice și sulfamide cu spectru larg, se pot instala stări de hipovitaminoză și chiar de avitaminoză, cu consecințe grave asupra sănătății organismelor. În general avitaminoza riboflavinei se manifestă în cadrul manifestărilor policarențiale care implică mai multe vitamine din complexul B.

La șobolan, starea de avitaminoză B_2 experimentală se manifestă prin încetarea creșterii, căderea părului, dermatite, afecțiuni oculare, ulcerații, scăderea rezistenței la infecții, steatoză hepatică, tulburări nervoase și endocrine, cu atrofierea testiculelor, leziuni la nivelul glandelor

Scanned with OKEN Scanner

tiroidiene și ale celor suprarenale. În stări de avitaminoză B_2, șobolancele au născut pui cu numeroase anomalii, datorită unor efecte teratogenice.

La câine, starea de avitaminoză se manifestă prin tulburări cutanate, oculare, anemie, degenerescență musculară, lipsa poftei de mâncare. La porc starea de avitaminoză determină o scădere accentuată a fertilității și moartea purceilor în proporție ridicată. La puii de găină lipsesc leziunile cutanate dar apar leziuni nervoase cu paralizarea picioarelor, mers greoi și o încetare a creșterii. La găinile ouătoare apar tulburări de mers, leziuni ale nervilor periferici și scăderea accentuată a ouatului. Alte afecțiuni care apar în stări de hipovitaminoză sunt involuția timusului, alterări ale glandelor tiroidiene și suprarenale, paralizia parțială a gambelor, alopecie (căderea simetrică a părului) etc. Animalele bolnave tratate cu riboflavină pură se refac relativ repede.

În cursul carenței de vitamină B_2 la șobolan apare hiperglicemie, care scade prin administrarea de riboflavină. La oamenii diabetici injecțiile cu riboflavină micșorează glicemia.

Hipovitaminoza B_2 la oameni s-a semnalat în trecut în China, Africa de Sud, Haiti, America de Sud, la oamenii care aveau o hrană foarte săracă în substanțe proteice. Ea se manifesta prin simptome similare pelagrei și prin dureri ale picioarelor, alterarea gingiilor, apariția de eriteme, fotofobie, slăbirea rezistenței la infecții, apariția conjunctivitelor, crampe musculare, unghii casante, atrofierea papilelor limbii, enterită cronică, migrene etc.

Avitaminoza riboflavinică experimentală la om poate determina oprirea creșterii la tineri și moartea subită la oamenii adulți.

În cazuri de hipovitaminoză apare o scădere accentuată a organismului față de infecții, apariția de conjunctivite, inflamarea gurii, îngroșarea și înroșirea limbii, căderea părului, dereglări cutanate, oculare, anaclorhidrie, care poate determina anemia care apare ulterior. Apar de asemenea leziuni ale buzelor, dilatarea pupilei, tulburări digestive, dificultăți la urinare.

Tulburările la nivelul gurii și a aparatului digestiv se manifestă prin apariția cheilozei (inflamarea, eritemul și fisurarea colțurilor gurii cu apariția zăbelelor), stomatite angulare, inflamarea și înroșirea limbii (limba magentă), glosodinie (dureri ale limbii), dermatite la pleoape și nas, congestia mucoasei buco-faringiene, aclorhidrie gastrică, prurit, dermatite seboreice și la nivelul scrotului. Tulburările oculare, care sunt cele mai importante, se manifestă prin oboseală vizuală, fotofobie, scăderea vederii la soare și pe zăpadă lucitoare, probabil datorită degradării riboflavinei din retină sub acțiunea radiațiilor UV, apariția de conjunctivite, opacifierea corneei și apariția de cataracte. Uneori apare și o pigmentare a irisului.

Afecțiunile nervoase se manifestă prin tulburări ale reflexelor, astenie, pareze, nistagmus, ataxia membrelor inferioare, senzație de arsură la nivelul tălpii picioarelor, tremurături etc.

Apar, de asemenea, numeroase dereglări metabolice, scade procesul de fosforilare activă precum și metabolizarea glucidelor, lipidelor și a proteinelor, inclusiv metabolizarea triptofanului cu consecințe negative asupra biosintezei endogene a vitaminei PP. Se produce o scădere a

Scanned with OKEN Scanner

activității glutationreductazei eritrocitare și a tuturor enzimelor care conțin FMN și FAD. Activitatea glutationreductazei eritrocitare este un indice de apreciere a stării de hipovitaminoză B_2, respectiv a conținutului FAD din sânge.

Starea de hipovitaminoză B_2 se instalează mai ușor la oameni cu afecțiuni cronice (reumatism, tuberculoză, endocardită bacteriană, diabet, hipertiroidism, ciroză hepatică). La fel la femeile care iau multe contraceptive, la oamenii care exclud laptele din hrana lor, la cei alcoolici sau care se găsesc cronic în stare de stres.

În stări de hipovitaminoză, o doză de 10 mg de vitamina B_2 administrată zilnic, o perioadă de 2—3 săptămâni determină dispariția simptomelor stării carențiale și vindecarea organismului.

Hipervitaminoze apar foarte rar la om și la animale în mod natural. Ea se produce totuși pe cale experimentală. Vitamina B_2 nu prezintă efecte toxice. Câinele și șobolanii suportă injecții cu 2 g/kg corp de vitamina B_2, fără să prezinte simptome de toxicitate, iar oral doze de 10 g/kg corp.

La om, doze de 30 mg vitamină B_2 date zilnic o perioadă îndelungată pot determina simptome atribuite de unii, hipervitaminozei care se manifestă prin crampe musculare nocturne, dureri ale gambelor, poliurie etc. Nu s-au semnalat simptome ale hipervitaminozei naturale la om. La șoareci și șobolani apar simptome de toxicitate dacă se administrează oral 20 g/kg corp/zi riboflavină sau FMN, respectiv 0,56—1,55 g prin injecții intraperitoneale și 0,910 g/kg corp/zi prin injecții intravenoase.

Lipsa de toxicitate a vitaminei B_2 a fost verificată la iepuri, șobolani, șoareci, găini, cobai, pești, câini etc. Prin administrarea a 300 mg de vitamina B_2 dată intraperitoneal, în prezența unei cantități mari de NaCl timp de 2—5 zile, s-a produs moartea la șobolani, printr-un blocaj renal, în rinichi aflându-se concretiuni cristaline.

8.9. INTERRELAȚII VITAMINICE ȘI HORMONALE

Vitamina C are o acțiune sinergică cu a vitaminei B_2 în unele procese metabolice. Vitamina C diminuează simptomele care apar în stări carențiale de riboflavină și stimulează creșterea puilor în stări de hipovitaminoză B_2. Acțiunea sinergică se manifestă și între riboflavină și vitamina PP. În stări de hipovitaminoză B_2 cresc necesitățile pentru vitamina PP și invers. Dozele mari de tiamină determină o excreție accentuată a riboflavinei prin urină. Vitamina B_2 participă alături de vitamina A în procesul vederii. Acțiuni sinergice s-au semnalat și în ce privește vitaminele B_2 și B_{12}. Vitamina B_2 poate suplini efectul vitaminei B_{12} în ce privește creșterea puilor de găină.

Riboflavina are o acțiune protectoare (de conservare) a tiaminei. Hormonii steroizi, în special cei corticosuprarenali stimulează fosforilarea riboflavinei. În metabolismul glucidic riboflavina are acțiune sinergică cu insulina.

Scanned with OKEN Scanner

8.10. ANTIVITAMINE

Numeroase antivitamine se pot obține pe cale de sinteză prin înlocuirea unor componente din molecula riboflavinei. Astfel înlocuirea D-ribitilului cu galactil (galactoflavina) sau a D-aribitil (araboflavina) din molecula ribcflavinei dă naștere unor compuși cu acțiune antiriboflavinică aspura șobolanilor. Tot antiriboflavine se obțin și prin scurtarea catenei ribitilului la compuși cu C_2 sau prin eliminarea grupărilor hidroxilice de la C-3', C-4' și C-5'. Lixoflavina (derivat cu lixil) în concentrații mici are efecte vitaminice similare riboflavinei, iar la concentrații mari se comportă ca o antivitamină.

Izoriboflavinele, formate prin suprimarea sau înlocuirea celor doi metili de la C-6 și C-7, se comportă ca antiriboflavine. Dintre acestea fac parte 6, 7-dietil-riboflavina; 6-metil-7-aminoriboflavina; 6- sau 7-clor (sau brom)-riboflavina; 6, 7diclor (sau dibrom)-riboflavína, care au acțiune antiriboflavnică aspura creșterii microorganismelor *Bacterium lactis acidi, Ermothecium ashbyi, Staphylococuli aureus, S. planarum* etc. Compusul 6,7-diclor-9-(D-1'-sorbitil)-izoaloxazina are acțiune antitumorală la șobolan, fapt pentru care se folosesc și antiriboflavine în tratamentul cancerului mamar. Flavotina (9-(D-1'-sorbitol)-izoaloxazina) inhibă „in vivo" activitatea xantinoxidazei din tumori, dar nu și în țesuturile normale.

Antagoniștii structurali ai riboflavinei pot manifesta competiție pentru coenzimele (FMN, FAD) ale flavinenzimelor, inhibarea fosforilării riboflavinei, fosforilarea enzimatică a inhibitorilor cu formarea unor analogi structurali ai FMN și FAD cu activitate biologică foarte redusă, sau chiar fără activitate biologică.

Dintre analogii structurali ai riboflavinei care acționează intens prin inhibiție competitivă, face parte izoriboflavina (5,6-dimetil-9-(D-1'-ribitil)-izoaloxazina) (fig. 8.8), care inhibă creșterea a numeroase microorganisme și a șobolanilor.

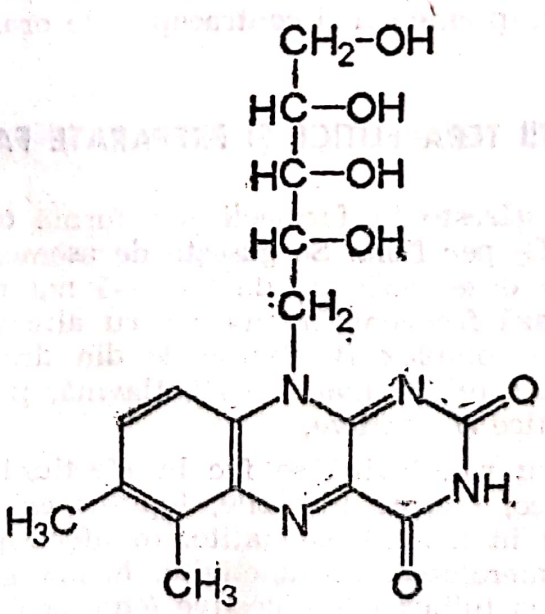


Fig. 8.8. Structura izoriboflavinei

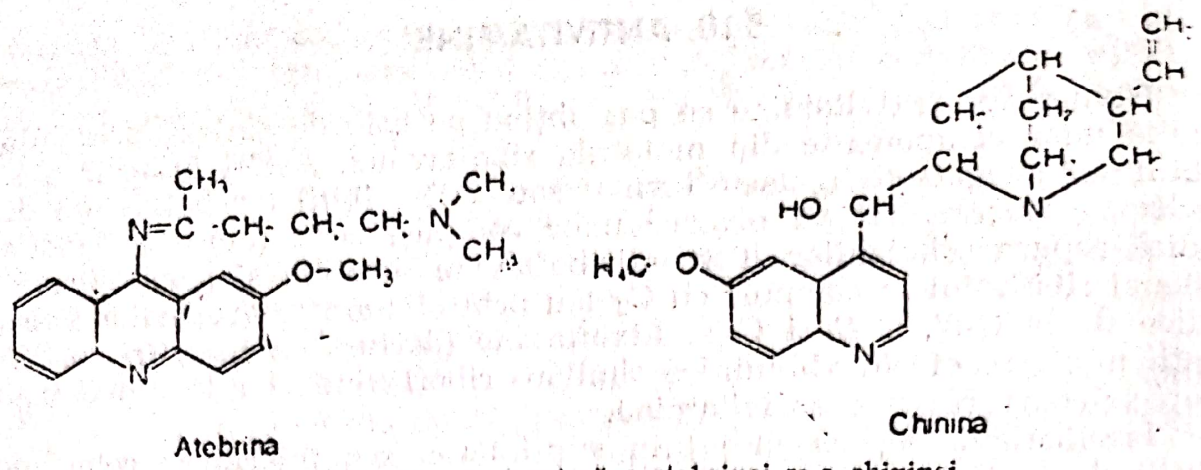


Fig. 8.9. Structura moleculară a stebrinei şi a chininei

Dintre substanţele cu structură diferită de a riboflavinei (heterologi şi nu homologi) care se comportă ca antivitamine B_2 sunt: atebrina şi chinina (fig. 8.9), care inhibă activitatea enzimelor FAD cum sunt citocromreductaza, D-aminoacidoxidaze etc. Adaosul în exces de FAD înlătură inhibarea, fapt ce indică o inhibare de tip competitiv prin analogie structurală.

Tetraciclinele, talidomidele şi sulfamidele au acţiune antagonistă faţă de riboflavină, mai ales asupra unor microorganisme.

Unele medicamente (ouabain) folosite în tratamente anticongestive, teofilină (relaxant al muşchilor, diuretic şi stimulent al sistemului nervos central), penicilina, acidul boric, determină desfacerea enzimelor flavinice în apoenzimă şi coenzimă şi astfel împiedică transportul enzimelor flavinice la sistemul nervos central. Probenecidul inhibă absorbţia gastrointestinală a riboflavinei şi secreţia acesteia la nivelul rinichilor. Cloropromazina, care este un analog structural al riboflavinei, împiedică formarea FAD-ului.

Dintre alte medicamente cu efecte negative asupra absorbţiei şi activităţii riboflavinei, fac parte fenotiazinele (majoritatea tranchilizante), barbituricele, streptomicina şi contraceptivele orale.

8.11. INDICAŢII TERAPEUTICE ŞI PREPARATE FARMACEUTICE

Riboflavina se găseşte în farmacii sub formă de fiole care conţin 1—2 mg vitamină B_2 per fiolă. Se găseşte de asemenea în tablete, drajeuri şi capsule, în doze variabile de 2—3—5 mg riboflavină. Riboflavina se administrează frecvent în amestec cu alte vitamine sub formă de polivitamine sau complex B. Extractele din drojdii, tărâţele cerealelor şi ficat conţin cantităţi mari de riboflavină, putând fi utilizate în tratamente profilactice şi curative.

Tratamentele cu riboflavină se fac în afecţiuni dermice cum sunt dermatitele seboreice, eczeme infantile, lupulus eritematos, prurit etc., iar la nivelul gurii în keiloză, stomatite. În afecţiunile oculare se tratează fotofobia, hemeralopia, conjunctivite, hemoragii retiniene etc. Se tratează de asemenea tulburările digestive (enterocolite), insuficienţe hepatice, afecţiuni alergice, astm bronşic etc. FMN se aplică în stări poli-

Scanned with OKEN Scanner

carențiale, în doze de 2—15 mg/zi, în keiloză, stomatită augulară, conjunctivite, crampe musculare etc., iar pentru stimularea creșterii se dă în doze de 0,5 mg/zi la copii sub 2 ani și 10 mg/zi la tineri peste 15 ani (BEDELEANU, 1985).

Becozym reprezintă un preparat farmaceutic care conține vitamina B_2 și alte vitamine din complexul B. Acest preparat conține componenții sistemelor enzimatice implicate în metabolismul glucidelor, lipidelor și a proteinelor. El se recomandă la alcoolici, în afecțiuni hepatice, polinevrite, în stări de slăbiciune, pentru protecția florei intestinale etc. Se dă sub formă de drajeuri (20, 100 mg), picături (20 ml), sirop (100 ml), capsule etc.

Becozym C este un complex vitaminic neurotropic. Gradul de solubilitate în apă a vitaminelor B_2 crește prin amestec cu vitamina C. Efectele terapeutice sunt mai rapide decât în tratamentul cu Becozym simplu. Se aplică pentru stimularea creșterii, femeilor gravide și în perioada de lactație, pacienților tratați cu antibiotice sau cu agenți chimoterapeutici, în intoxicații cu alcool, metale grele, ciuperci, solvenți organici, în distrofii neurologice etc.

Decarece riboflavina are o culoare galbenă-luminoasă ea se adaugă uneori ca marker în diferite preparate farmaceutice (drajeuri, fiole, soluții, tablete, capsule etc.). Colorarea mai intensă a urinii în urma administrării preparatelor farmaceutice denotă o bună absorbție a medicamentelor. Riboflavina se adaugă în făină și preparatele de panificație pentru compensarea pierderilor care apar în procesele tehnologice de obținere a acestor produse. De asemenea se adaugă în lapte și în diferite preparate dietetice.

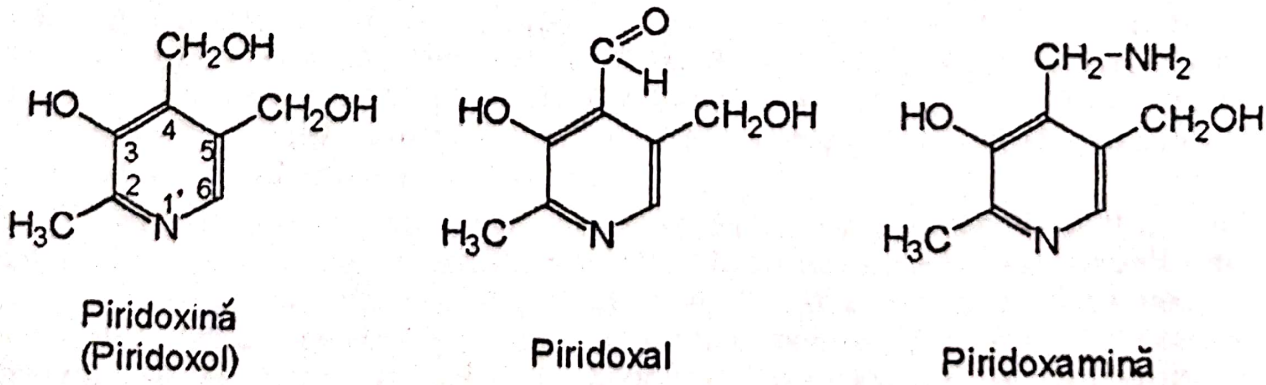
Scanned with OKEN Scanner

Capitolul 9. VITAMINA B_6

9.1. Scurt istoric 229
9.2. Structura moleculară 230
9.3. Proprietăţi fizice şi chimice 232
9.4. Metode de identificare şi dozare 233
9.5. Răspândire în natură 234
9.6. Absorbţie, excreţie şi necesităţi 236
9.7. Rol şi activitate biologică 237
9.8. Hipovitaminoze şi hipervitaminoze 243
9.9. Interrelaţii vitaminice 246
9.10. Analogi structurali şi antivitamine 246
9.11. Indicaţii terapeutice şi produse farmaceutice 248

Vitamina B_6 se mai numeşte *piridoxină, adermină* şi *vitamina antipelagroasă a şobolanului.* Numele de piridoxină provine de la structura sa moleculară deoarece este un alcool cu nucleu piridinic. Denumirile de adermină sau de vitamina antipelagroasă a şobolanului derivă de la proprietatea sa de a vindeca o dermatită specifică a şobolanului.

În natură vitamina B_6 se găseşte sub trei forme vitamere, care se deosebesc între ele printr-o grupare funcţională caracteristică, legată de C-4 al nucleului piridinic. Astfel forma *piridoxol* sau *piridoxină* conţine o grupare hidroxilică, *piridoxalul* conţine o grupare aldehidică, iar *piridoxamina* conţine o grupare aminică (Figura 9.1.).



Piridoxină (Piridoxol) — Piridoxal — Piridoxamină

Fig. 9.1. Structura piridoxinei, piridoxalului şi pirodoxaminei

Scanned with OKEN Scanner

Toate aceste forme vitamere (compușii sunt derivați piridinici) se găsesc împreună cu numeroase produse vegetale și animale, au o acțiune biologică generală aproape identică, se pot transforma reciproc una în alta și alcătuiesc împreună *grupul vitaminelor* B_6.

Prin fosforilarea piridoxalului și a piridoxaminei se formează esterii lor monofosforici numiți piridoxalfosfat (PALP) și piridoxaminfosfat, care îndeplinesc rolul de coenzime în numeroase sisteme enzimatice implicate în metabolismul aminoacizilor (transaminaze, decarboxilaze, dezaminaze, transsulfataze etc.), al glucidelor, lipidelor și a altor substanțe.

Vitamina B_6 acționează predominant asupra sistemului nervos și a celui muscular, asigurând buna funcționare a acestora. Stimulează biosinteza proteinelor fiind absolut necesară în perioadele de creștere intensivă, la femei în timpul graviditații și a perioadei de lactație. Are un rol esențial în biosinteza substanțelor care transmit stimulii de la o celulă la alta și de la terminațiile nervoase la țesuturi. Inima, creierul, ficatul, rinichii, pielea, funcționează normal numai în cantități suficiente de vitamina B_6 pentru organism.

9.1. SCURT ISTORIC

Vitamina B_6 a fost semnalată în perioada când se efectuau cercetări pentru vindecarea dermatitei carențiale a șobolanului albinos denumită „acrodinie" sau „pelagra șobolanului", presupusă a se datora lipsei din hrană a vitaminei PP.

În 1926, *J. Goldberger, Wheeler, Lillie* și *Rogers* au administrat șobolanilor o dietă deficitară în factorul considerat că previne pelagra și au constatat că apar leziuni cutanate la nivelul labelor și a urechilor, eczeme, căderea părului etc. Se constată că afecțiunile nu dispar prin adăugarea de tiamină, riboflavină și nici chiar de vitamina PP. *P. György* afirmă ulterior că dermatita șobolanilor se datorează lipsei unui factor nou din complexul vitaminelor B. Se considera că pelagra șobolanului este identică cu cea umană și a puilor de găină.

P. György a fost primul care a demonstrat în 1934 că factorul care previne pelagra la șobolan este identic cu vitamina B_6 sau cu adermina, substanță capabilă să vindece afecțiunile dermatitice la șobolan. În lipsa acestei vitamine din hrana șobolanului, apare o dermatită specifică acestora, numită „pelagra șobolanului" sau „acrodinia șobolanului".

În 1935 *T. W. Brich, P. György* și *L. Harris* reușesc să diferențieze riboflavina și vitamina B_6 de factorul PP în lipsa căruia din organism, apare pelagra umană. Ei reușesc să diferențieze pelagra șobolanului de pelagra umană și de dermatita puilor de găină (A. C. ELVEHJEM, C. J. KOEHN, 1935).

În 1938, *S. Lepkovsky* este primul care comunică izolarea în stare pură a vitaminei B_6. În același an, vitamina B_6 a fost obținută și de alți cercetători (*György, Kuhn, Wend, Ichiba* și *Michi* etc.). Izolarea vitaminei B_6 s-a realizat din tărâțe de orez, drojdii, extracte din boabele de orez nedecorticat.

În 1939, *L. Harris* și *K. Folkers* determină structura piridoxinei și reușesc să o obțină prin sinteză. *E. Snell* reușește să descopere în 1945 cele două forme vitamere ale piridoxinei, numite piridoxal și piridox-

Scanned with OKEN Scanner

amină. *E. Snell* împreună cu *T. M. Brich, P. György, S. Harris, K. Folkers* au reușit ca, în perioada 1936 — 1955, să arate că piridoxina, piridoxalul și piridoxamina sunt forme interconvertibile metabolic ale vitaminei B_6 și pot îndeplini rolul de coenzime. În 1953, *S. E. Snyderman* și colab. au semnalat simptomele hipovitaminozei B_6 la copii. Acest grup de cercetători stabilesc în 1957 necesitățile oamenilor pentru vitamina B_6 (F. HOFFMANN LA ROCHE, 1994).

9.2. STRUCTURA MOLECULARĂ

Piridoxina este un derivat de piridină substituit la C-2 cu o grupare metil, la C-3 cu o grupare hidroxil, iar la C-4 și C-5 cu câte o grupare hidroximetil. Ea conține în moleculă un nucleu piridinic și are formula moleculară $C_8H_{11}O_3N$. Sub aspectul structurii chimice piridoxina este 2-metil-3-hidroxi-4,5-dihidroximetil-piridina (fig. 9.1).

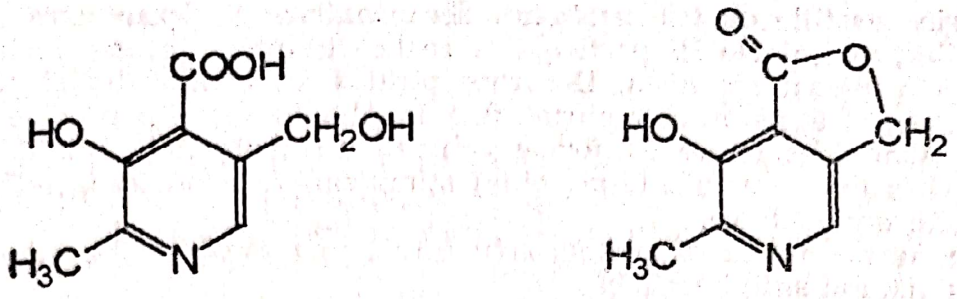
Vitamina B_6 naturală este formată din trei derivați piridinici (vitamere) care diferă între ei prin grupările funcționale legate de C—4, piridoxina sau piridoxolul are grupare alcoolică (C—4—CH_2OH), piridoxalul are grupare aldehidică $\left(C-4-C\begin{matrix}O\\H\end{matrix}\right)$, iar piridoxamina are grupare aminică (C—4—CH_2—NH_2). Prin oxidarea grupării hidroxilice din hidroximetilul legat de C—4 se obține piridoxalul (PAL), iar prin substituirea aceleași grupări hidroxilice cu o grupare aminică se obține piridoxamina. Piridoxina predomină cantitativ în organismele vegetale, iar piridoxalul și piridoxamina în organismele animale.

Poziția hidroxilului fenolic de la C-3 al piridoxinei s-a stabilit cu reactivul Folin-Denis, caracteristic acestor grupări, cu care vitamina B_6 dă o coloratie albastră. Spectrul de absorbție al piridoxinei este analog cu cel al β-hidroxipiridinei. Cu reactivul 2,6-diclor-chinonclorimida, vitamina B_6 dă o coloratie albastră, fapt ce indică că hidroxilul de la C-3 este în stare liberă. Metileterul vitaminei B_6 nu reacționează cu tetraacetatul de plumb, fapt ce confirmă că grupările hidroximetilice se găsesc la C-4 și C-5 nu în pozițiile α sau β a nucleului piridinic. Metilul de la C-2 este în poziție α în raport cu azotul din heterociclu. Aceste elemente structurale și poziția lor în moleculă au fost confirmate prin sinteza piridoxinei din etoxiacetilacetonă și cianoacetamidă.

Piridoxalul se obține pe cale sintetică din piridoxină prin oxidarea acesteia cu $KMnO_4$—MnO_2 și $K_2Cr_2O_7$, iar piridoxamina se obține prin tratarea cu amoniac a piridoxinei acetilate. Prin oxidarea piridoxalului se formează acidul 4-piridoxic care a fost găsit împreună cu lactona sa (β-piracină) în urină, după ingerarea de piridoxină (fig. 9.2).

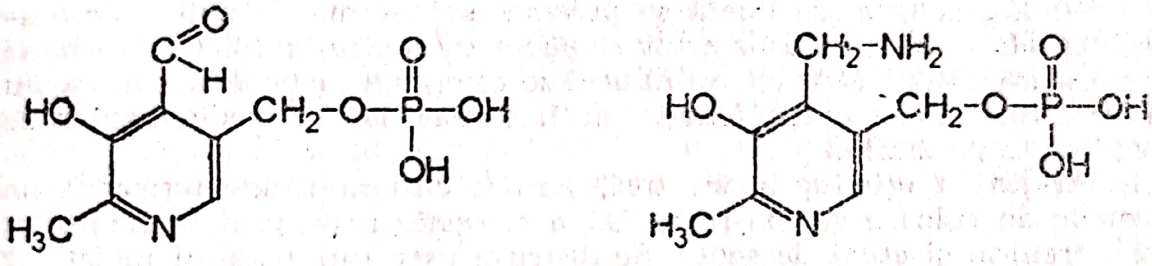
Grupările funcționale specifice ale piridoxinei, piridoxalului și piridoxaminei, legate la C-4, s-au dovedit nu numai pe cale chimică și spectroscopică (au spectre de absorbție diferite) ci și prin efectul acestor compuși asupra microorganismelor. Pentru *Lactobacillus casei* este mai eficace piridoxalul, în timp ce pentru *Streptococcus faecalis* este mai activă piridoxina. Asupra drojdiilor de bere și a vertebratelor toate cele trei forme vitamere ale vitaminei B_6 au aceiași activitate biologică. Datorită acțiunii diferite a acestor compuși asupra microorganismelor se folo-

Scanned with OKEN Scanner



Acid 4 - piridoxic ß - piracină

Fig. 9.2. Structura acidului 4-piridoxic şi a β-piracinei



Piridoxalfosfat (PALP) Piridoxaminfosfat

Fig. 9.3. Structura piridoxalfosfatului şi piridoxaminfosfatului

seşte adesea termenul de vitamine B_6 şi nu de vitamina B_6. „Vitaminele B_6" se transformă reciproc unele în altele, în cursul proceselor metabolice, iar piridoxalul şi piridoxamina prin fosforilare la hidroximetilul de la C-5 formează piridoxalfosfat (PALP) şi piridaminfosfat (fig. 9.3) care îndeplinesc rolul de coenzime în numeroase enzime, în special în cele de decarboxilare, transaminare, dezaminare, transsulfurare etc.

Piridoxalfosfatul se poate obţine prin sinteză din piridoxină, acid fosforic 85% şi pentaoxid de fosfor, prin protejarea grupării hidroximetilice de la C-4.

Piridoxina s-a obţinut iniţial în stare cristalină din drojdie şi coji de orez prin adsorbţie pe argilă, eluţie cu barită şi precipitare cu acid fosfotungstic.

Trasformarea piridoxinei în piridoxal şi a acesteia în piridoxamină se poate realiza uşor „in vitro" prin următoarele reacţii:

$$\text{Piridoxină} \xrightarrow[K_2Cr_2O_7,\ KMnO_4]{\text{Oxidare}} \text{Piridoxal} \xrightarrow[(NH_3)]{\text{Aminare}} \text{Piridoxamină}$$

În organismele vegetale şi animale transformarea piridoxalului în piridoxamină se realizează printr-un proces de transaminare, folosind ca donori de grupări amimice predominant acizii glutamic şi aspartic, iar ca acceptori de grupări NH_2 cetoacizii sau compuşi cu grupări aldehidice.

$$\text{Piridoxal} + \text{Acid glutamic} \xrightleftharpoons{\text{Transaminare}} \text{Piridoxamină} + \text{Acid } \alpha\text{-cetoglutaric}$$

Prin reacțiile de transaminare, decarboxilare și dezaminare a aminoacizilor, vitaminele B_6 participă la realizarea unor procese metabolice principale pentru organism. Deoarece piridoxina, piridoxalul și piridoxamina se pot transforma reciproc una în alta în diferite procese metabolice, sunt considerate ca forme echivalente enzimatic. Acidul 4-piridoxic și lactona acestuia (β-piracina) stimulează eritropoieza, având astfel efecte antianemice.

Se cunosc numeroși analogi structurali cu vitaminele B_6 dintre care unii au acțiune antivitaminică.

9.3. PROPRIETĂȚI FIZICE ȘI CHIMICE

Piridoxina în stare liberă se prezintă sub formă de pulbere cristalină, incoloră, cu gust ușor amar și punct de topire la 160°C. Are masa moleculară 169,2 UMA. În mediu acid se comportă ca un fenol. În mediu bazic formează un anion fenolat cu N terțiar, iar în mediu neutru se prezintă ca un amfion.

Piridoxina este optic inactivă, iar cu clorura ferică formează un compus de culoare galben-roșie. Dă o coloratie roșie prin încălzirea sa cu cloroform și etilat de sodiu. Se distruge ușor sub acțiunea radiațiilor ultraviolete.

Clorhidratul de piridoxină se prezintă sub formă de cristale incolore sau de pulbere cristalină albă, fără miros, cu gust acru și cu punct de topire în jur de 207°C, cu descompunere ușoară. Este ușor solubil în apă (o parte în 5 părți apă), iar soluția are caracter acid, cu pH 3 — 3,2. Este greu solubil în alcool (o parte la 100 părți alcool) și acetonă, iar practic insolubil în cloroform, benzen, eter.

Clorhidratul de piridoxal formează cristale rombice, cu punct de topire la 165°C, ușor solubil în apă (1 g în 2 ml apă), dar greu solubil în alcool (1 g în 60 ml etanol 96°). În soluție este mai stabil decât piridoxalul.

Piridoxamina este tot o substanță solidă, cristalină, incoloră, cu punct de topire la 193°C. Clorhidratul de piridoxamină cristalizează sub formă de plăcuțe hidroscopice, ușor solubile în apă (0,5 g la 1 ml apă), greu solubile în alcool (1 g la 155 ml etanol 96°), cu punct de topire la 226 — 227°C. Este mai sensibil la lumină decât piridoxamina în stare liberă.

Toate formele vitaminei B_6 sunt sensibile la acțiunea luminii. Ele prezintă în UV spectre de absorbție caracteristice care depind de pH. Conținutul total al acestora se determină spectrofotometric prin măsurarea intensității absorbției la 325 nm la pH 6,75. Dintre vitaminele B_6, piridoxamina este cea mai sensibilă. Ea poate fi distrusă de lumină într-o soluție acidă 0,1 n, în care celelalte forme vitaminice nu sunt distruse. În urma fotolizei anaerobe a piridoxinei se produc reacții de dimerizare cu formarea unor compuși de condensare de tip benzoine. Soluțiile neutre sau alcaline ale vitaminelor B_6, expuse la lumină, se degradează mai ușor decât soluțiile în mediu acid.

Vitaminele B_6 sunt rezistente la fierbere la 100°C, atât în mediu acid cât și in mediu bazic, cu excepția piridoxalului, care este sensibil

Scanned with OKEN Scanner

în soluție alcalină. La încălzire, în mediu acid, piridoxamina se distruge mai ușor decât celelalte forme.

Vitaminele B_6 sunt stabile la acțiunea oxidanților slabi (apă de brom, MnO_2, Ag_2O), în soluție alcalină, la temperatura camerei. Prin încălzire piridoxina trece sub acțiunea acestor oxidanți în piridoxal. Oxidanții puternici (HNO_3, $KMnO_4$, $K_2Cr_2O_7$, H_2O_2 etc.) distrug toate formele vitaminice B_6. Cu acidul boric, piridoxina formează complexe la nivelul hidroxililor de la C-3 și C-4, care își păstrează activitatea vitaminică.

Prin prelucrarea alimentelor se pierd cantități mari de vitamină B_6. Astfel prin fierberea sau frigerea cărnii se pierd 50% din vitaminele B_6, iar la obținerea unor preparate lactate între 36 — 70%. La prepararea conservelor de legume se pierd 77% din vitaminele B_6, iar la obținerea făinii foarte fine între 50 — 93% se ridică pierderile.

Piridoxalul și piridoxamina prezintă în unele procese metabolice o activitate vitaminică mai mare decât piridoxina, dar în soluții alcaline și la cald sunt mai instabile decât piridoxina și reacționează ușor cu alți componenți din mediu sau reacționează între ei cu formarea unor dimeri. În celule și țesuturi piridoxalul și piridoxamina se găsesc predominant sub formă fosforilată, în stare liberă sau sub formă de coenzime.

9.4. METODE DE IDENTIFICARE ȘI DOZARE

Metode fizice. Dintre metodele fizice utilizate pentru identificarea și dozarea vitaminelor B_6, cele mai frecvent folosite sunt metodele spectrofotometrice, potrivite pentru soluțiile pure. Vitaminele B_6 prezintă spectre de absorbție caracteristice, având absorbția maximă la 291 nm în UV și în soluție de HCl 0,1 n, în soluție tampon la pH7 prezintă maxime de absorbție la 254 și 324 nm.

Metodele colorimetrice se bazează pe reacțiile de culoare pe care le dau aceste vitamine cu diferiți reactivi, iar prin metode fluorimetrice se măsoară fluorescența lactonei obținută din piridoxină. Se folosesc și metode cromatografice și electroforeza pe hârtie sau pe coloană de amidon cu ajutorul cărora se deosebesc piridoxina, piridoxalul și piridoxamina între ele, precum și de esterii fosforici (piridoxalfosfat și piridaminfosfat). Cromatografia pe hârtie de filtru cu propanol și acid formic este folosită pentru separarea rapidă a formelor libere de cele fosforilate. Prin cromatografia pe coloană cu schimbători de ioni la cald, urmată de oxidare cu $KMnO_4$ în mediu acid, se formează acidul piridoxic și apoi lactona sa, care poate fi determinată fluorimetric. Această metodă se aplică pentru determinarea formelor libere și a celor fosforilate ale vitaminei B_6 din produse biologice.

Metode chimice. Metodele chimice se bazează pe reacțiile de culoare pe care le dau vitaminele B_6 cu diferiți reactivi. Astfel, cu $FeCl_3$ vitaminele B_6 dau o culoare roșie, reacția nefiind specifică. Cu reactivul Folin-Denis (acid fosfotungstic/fosfomolibdenic), vitaminele B_6 dau o culoare albastră, datorită hidroxilului fenolic de la C-3. Cu diazometanul, iodura de metil, dimetil sulfat, la încălzire cu cloroform și soluție 20% de KOH, vitaminele B_6 tot datorită hidroxilului fenolic formează o fru-

Scanned with OKEN Scanner

moasă coloraţie violetă cu maxime de absorbţie la 555 şi 559 nm în cloroform sau alcool şi la 543, 592 nm în soluţie 20% de KOH. Cu derivaţii diazoici ai acidului sulfanilic, cu p-aminoacetofenona şi cu p-nitranilina se obţin compuşi coloraţi, colorimetrabili. Reacţii de culoare se obţin şi cu 2,6-diclorchinonclorimida, reacţie de mare sensibilitate. Peste soluţia de vitamina B_6 se adaugă 2,6-diclorchinonclorimida în butanol şi o soluţie tampon de veronal la pH 7,6. Se obţine o coloraţie albastră cu maxim de absorbţie la 600 nm. Compusul format se poate măsura colorimetric sau spectrofotometric. Reacţiile de culoare cu cianură sunt utilizate pentru identificarea şi dozarea eterilor metilici ai sărurilor cuaternare de piridoxină.

Metodele biologice. Metodele biologice se folosesc ca test pe animale şi microorganisme.

În cadrul metodelor microbiologice se foloseşte testul de creştere a drojdiei *Saccharomices cerevisiae* sub acţiunea vitaminelor B_6 şi a unor bacterii *(Streptobacterium plantarum)*. Pentru separarea piridoxinei, piridoxalului şi piridoxaminei se foloseşte un mutant de *Neurospora sitophila*, obţinut cu raze X pentru care piridoxina este o substanţă de creştere, iar piridoxalul şi piridoxamina nu au efect. Pentru *Streptococcus faecalis*, piridoxalul şi piridoxamina sunt substanţe de creştere, în timp ce piridoxina nu are efect stimulativ. *Lactobacillus casei* este activ la acţiunea piridoxalului.

Testul pe şobolani constă fie în determinarea cantităţii de vitamină B_6 necesară pentru vindecarea acrodiniei provocată în avitaminoză experimentală, fie în determinarea creşterii în greutate după adăugarea treptată în hrană a vitaminei B_6. În administrarea per os a vitaminelor B_6, piridoxina este mai activă decât piridoxalul şi piridoxamina. Prin injecţii intraparientale cele trei forme ale vitaminei B_6 determină acelaşi ritm de creştere la şobolan.

Testele biochimice şi cele clinice se bazează pe determinarea vitaminelor B_6 din sânge şi urină. Din urină se determină acidul piridoxic, care în mediu acid trece în lactonă fluorencentă. Se foloseşte de asemenea testul cu L-triptofan. Se administrează la copii o doză de 50 mg/kg corp de L-triptofan, iar la adulţi o doză de 2 g şi se determină conţinutul acidului xantureic din urină în 24 de ore. Dacă se elimină peste 30 mg acid xantureic/24 de ore înseamnă că organismul se află în stare de hipovitaminoză B_6. La fel se procedează în testul cu metionină şi se determină din urină cistationina. „In vitro" se determină activitatea glutamicooxalaceticotransaminazei (GOT) din hematii, sub acţiunea vitaminelor B_6.

Unitatea Internaţională (sau Unitatea Şobolan) este de 10 μg piridoxină, care administrată zilnic, asigură vindecarea acrodiniei la şobolan.

9.5. RĂSPÂNDIRE ÎN NATURĂ

Vitamina B_6 este larg răspândită în organismele vegetale şi animale. Sursele cu conţinut ridicat de vitamina B_6 sunt drojdia de bere, coaja bobului de orez, polen, seminţele cerealelor, ficatul animalelor, carnea de peşte, gălbenuşul de ou etc. În tabelul 9.1 se prezintă conţinutul vitaminei B_6 din unele produse vegetale şi animale. Conţinutul vitaminei B_6 din ierburi proaspete de pajişte variază între 8 — 19 μg/g.

Scanned with OKEN Scanner

Tabelul 9. 1

Conținutul vitaminei B_6 din produse vegetale și animale

Produs	Vitamina B_6 mg/100 g	Produs	Vitamina B_6 mg/100 g
Drojdie uscată	4 —10	Ficat de berbec, viței	1 —2,5
Drojdie de bere	4 —8	Mușchi de berbec, vită, viței	0,3 —0,7
Boabe de soia	1 —9	Găină, jambon	1,5 —2,5
Semințe grâu, orez	0,3 —0,6	Gălbenuș de ou	0,18—0,2
Semințe porumb, orz, ovăz	0,7 —4	Lapte de vacă	0,05—0,3
Germeni de grâu, porumb	1 —5	Lapte uman	0,01—0,02
Făină de grâu	0,4 —0,7	Lapte praf	0,5 —0,6
Portocale, pere, banane	0,1 —0,5	Carne de porc	0,2 —1,7
Varză, cartofi, mazăre, salată, fasole, spanac	0,1 —0,5	Rinichi de porc	0,8 —2,7
Morcov	1,2	Ficat de vacă	1,7
Struguri	0,94—1,1		

În general vitamina B_6 apare în natură sub formă de complexe, legată de proteine sau amidon, precum și sub formă de complexe organometalice și mai puțin în stare liberă. Din complexe, vitamina B_6 se poate separa prin hidroliză enzimatică sau prin dializă și adsorbție ulterioară pe cărbune sau pe zeoliți.

Din mușchiul de pește, prin extracție cu apă, nu se poate obține decât 25% din totalul vitaminei B_6, fiind nevoie de o hidroliză papainică pentru extragerea cantității totale.

Vitamina B_6 se găsește în aproape toate țesuturile și organele la om. În cantitate mai mare se găsește în ficat, care se pare că reprezintă principalul organ de depozit. Conținutul piridoxinei la femeie, bărbat și șobolan se prezintă în tabelul 9.2.

Tabelul 9.2

Conținutul piridoxinei din diferite țesuturi și organe la femeie și șobolan, exprimat în μg/g

Organ/Țesut	Femeie	Bărbat	Șobolan
Ficat	1,9	3,0	1,9
Mușchi, schelet	1,1	0,72	1,2
Inimă	0,91	0,64	1,4
Creier	0,6	0,7	0,94
Rinichi	0,73	1,4	1,6
Inimă	0,91	0,64	1,4
Suprarenale	0,19	0,14	0,25
Plămân	0,24	0,7	0,28
Testicul	—	0,9	0,31
Ovar	0,15	—	—
Glandă mamară	0,43	—	—
Stomac	0,38	0,18	0,24
Splină	0,12	0,06	0,39

Scanned with OKEN Scanner

Capacitatea de depozitare a vitaminelor hidrosolubile în organism este mult mai mică decât a vitaminelor liposolubile. Cantități mici de piridoxină se găsesc în toate țesuturile. În cantități mai mari piridoxina se găsește în ficat, mușchi, inimă, rinichi și creier. Conținutul normal al piridoxinei din sânge este în jur de 3 — 0,5 μg/100 ml, iar în ser 3 — 8 μg/100 ml. O bună parte din piridoxină se găsește în organism sub formă de coenzime active cum sunt piridoxalfosfatul și piridoxamilfosfatul. Conținutul piridoxalfosfatului din serul oamenilor adulți este în medie de 1,2 μg/100 ml, iar la copii de 0,9 μg/100 ml. La femei, în perioada gravidității scade până la 0,25 μg/100 ml.

Dintre formele vitaminelor B_6 în organismele vegetale predomină piridoxina (55 — 60%), iar în organismele animale piridoxalul și piridoxamina.

Vitamina B_6 este biosintetizată de numeroase bacterii, dintre care *Acetobacter xilinum* produce 3,6 μg/48 ore la 30°C. Unele microorganisme ca *Acetobacter aerogenes, Proteus vulgaris, Pseudomonas fluorescens, Clostridium butylicum,* biosintetizează piridoxina cu o viteză de 3 — 5 molecule pe secundă.

La plantele verzi cantități mai mari de vitamina B_6 se găsesc în frunze, iar la cereale și leguminoase crește în timpul procesului de germinare.

9.6. ABSORBȚIE, EXCREȚIE ȘI NECESITĂȚI

Absorbția vitaminei B_6 în stare liberă se realizează cu ușurință la nivelul intestinului subțire. Vitamina B_6 combinată cu proteine va suferi în prealabil o hidroliză în stomac și parțial în intestin, iar după eliberarea sa din diferite complexe, se va absorbi prin mucoasa intestinală și va ajunge în sânge și în organele de depozit. După câteva ore de la absorbție, piridoxina ajunge în hematii unde este oxidată la piridoxal, iar prin fosforilarea acesteia se formează coenzima piridoxalfosfat, care trece în plasmă.

Eliminarea vitaminei B_6 se face în cea mai mare parte pe cale renală, prin urină. Omul sănătos adult excretă în 24 de ore aproximativ 500 — 700 μg de vitamina B_6. Formele de eliminare sunt compuși de conjugare cu acidul glucuronic la nivelul hidroxilului de la C-3 al piridoxinei, acidului piridoxic (80%) și lactona sa care imprimă urinei o fluorescență albăstruie și alți compuși de metabolizare. Prin fecale se elimină 0,7 — 0,9 mg/24 ore la adulți și 0,13 — 0,15 mg/zi la copii, cu variații în raport de natura alimentelor folosite. Prin administrarea a 50 mg de piridoxină se elimină prin urină 8% din cantitatea acesteia. În anumite tulburări metabolice excreția vitaminei B_6 este mult redusă. La bătrâni excreția vitaminei B_6 este mai scăzută decât la tineri, probabil din cauza unei filtrări renale defectuoase.

Nu toată cantitatea de piridoxină ingerată este eliminată din corp deoarece „in vivo" piridoxina se transformă în alte substanțe, care de asemenea se elimină prin urină, iar o parte din acestea provin din piridoxina ingerată. Prin experiențe efectuate pe șobolani s-a remarcat că la un conținut de 10 mg/kg corp de piridoxină, 60 — 70% din aceasta

Scanned with OKEN Scanner

se elimină prin urină. La câine s-au identificat în urină compuși de conjugare ai piridoxinei cu acidul glucuronic, acidul sulfuric, precum și metaboliți de tipul acidului 4-piridoxic. La un pacient tânăr s-a constatat că în decurs de 8 ore s-a excretat prin urină 85% din piridoxina administrată sub formă de acid 4-piridoxic și lactonele sale, 4 — 4,5% sub formă de piridoxină și 7 — 8% sub forma altor metaboliți.

Necesitățile în vitamina B_6 pentru omul adult sunt de 1 — 2 mg/zi care se acoperă cu ușurință prin hrană și prin biosinteza microflorei intestinale. Copiii, gravidele, femeile care alăptează și bătrânii au necesități crescute, până la 2,5 mg/zi. Cantități sub 0,5 mg/zi de vitamina B_6, administrate o perioadă mai îndelungată, duc la apariția unor stări carențiale. Doza zilnică necesară de vitamină B_6 pentru șobolan este de 10 μg, iar la puii de găină de 30 μg/zi.

Vitamina B_6 este necesară unui mare număr de bacterii și animale inferioare (moluște, insecte, viermi, melci etc.), care nu o pot sintetiza. Animalele ierbivore depind într-o măsură mai mică de aportul alimentar al vitaminei B_6, întrucât o cantitate însemnată din această vitamină este biosintetizată de numeroase microorganisme în prestomace și în intestinul gros. Unele insecte și viermi, ca *Drosophyla melanogaster, Tenebrio molitor, T. confusus, Bombix mori* etc., au nevoie de piridoxină ca factor esențial de creștere.

9.7. ROL ȘI ACTIVITATE BIOLOGICĂ

Vitamina B_6, sub cele trei forme structurale, are un rol multiplu și complex în organismele vegetale și animale. Mai ales sub formă de piridoxalfosfat, cu rol de coenzimă, ia parte în numeroase procese metabolice ale proteinelor, glucidelor, lipidelor și a altor substanțe, contribuind atât la biosinteza, cât și la degradarea unor compuși (aminoacizi, monoglucide, acizi organici, compuși heterociclici etc.), precum și la stabilirea unor interconversiuni și a unor interrelații metabolice între diferite grupe de substanțe, dând posibilitatea organismului să utilizeze cât mai eficient substanțele existente în hrană.

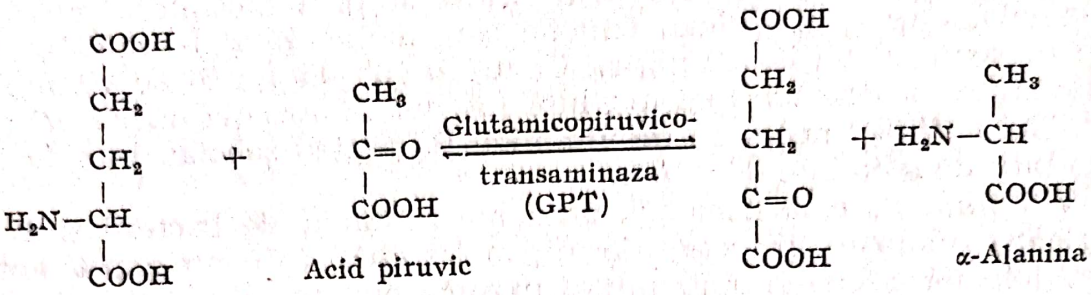
Piridoxalfosfatul (PALP) sub formă de coenzimă, îndeplinește un rol esențial în metabolismul aminoacizilor și al substanțelor proteice, luând parte la înfăptuirea unor reacții de transaminare, decarboxilare, dezaminare, în metabolismul triptofanului, a aminoacizilor cu sulf, hidroxiaminoacizilor, a nucleelor porfirinice, cu consecințe în formarea unor hormoni, fitohormoni, amine biogene etc., contribuind indirect la reglarea unor procese metabolice, la funcționarea normală a unor țesuturi și organe din organismele vegetale și animale.

Piridoxalfosfatul formează cu ionii metalici (Cu^{2+}, Fe^{2+}, Mg^{2+}, Al^{3+} etc.) și cu unii aminoacizi, chelați care, prin scindare în moduri diferite, pot da naștere la diferiți compuși.

a. **Reacții de transaminare.** Dintre enzimele care conțin piridoxal-5-fosfat menționăm transaminazele, numite și aminoferaze, care catalizează transferul unei grupări aminice de pe un aminoacid pe un cetoacid, cu formarea unui nou aminoacid și a unui nou cetoacid. Prin transaminare se produce atât biosinteza cât și degradarea aminoacizilor, fără să par-

Scanned with OKEN Scanner

ticipe sau să se elibereze aminoacidul liber. Ca donori principali de grupări aminice sunt acizii glutamic și aspartic, precum și amidele lor (glutamina și asparagina), iar ca acceptori principali de grupări aminice sunt acizii α-cetoglutaric, oxalilacetic și piruvic. Se cunosc numeroase reacții de transaminare, dar vom prezenta ca model reacția de transaminare dintre acidul glutamic și acidul piruvic, cu formarea acidului α-cetoglutaric și a α-alaninei, conform relației:



Acid glutamic — Acid piruvic — Acid α-cetoglutaric — α-Alanina

În transaminările biologice un rol fundamental îl au coenzimele piridoxalfosfat și piridoxaminfosfat, care participă în meconismul transferării grupărilor aminice, conform schemei din figura 9.4.

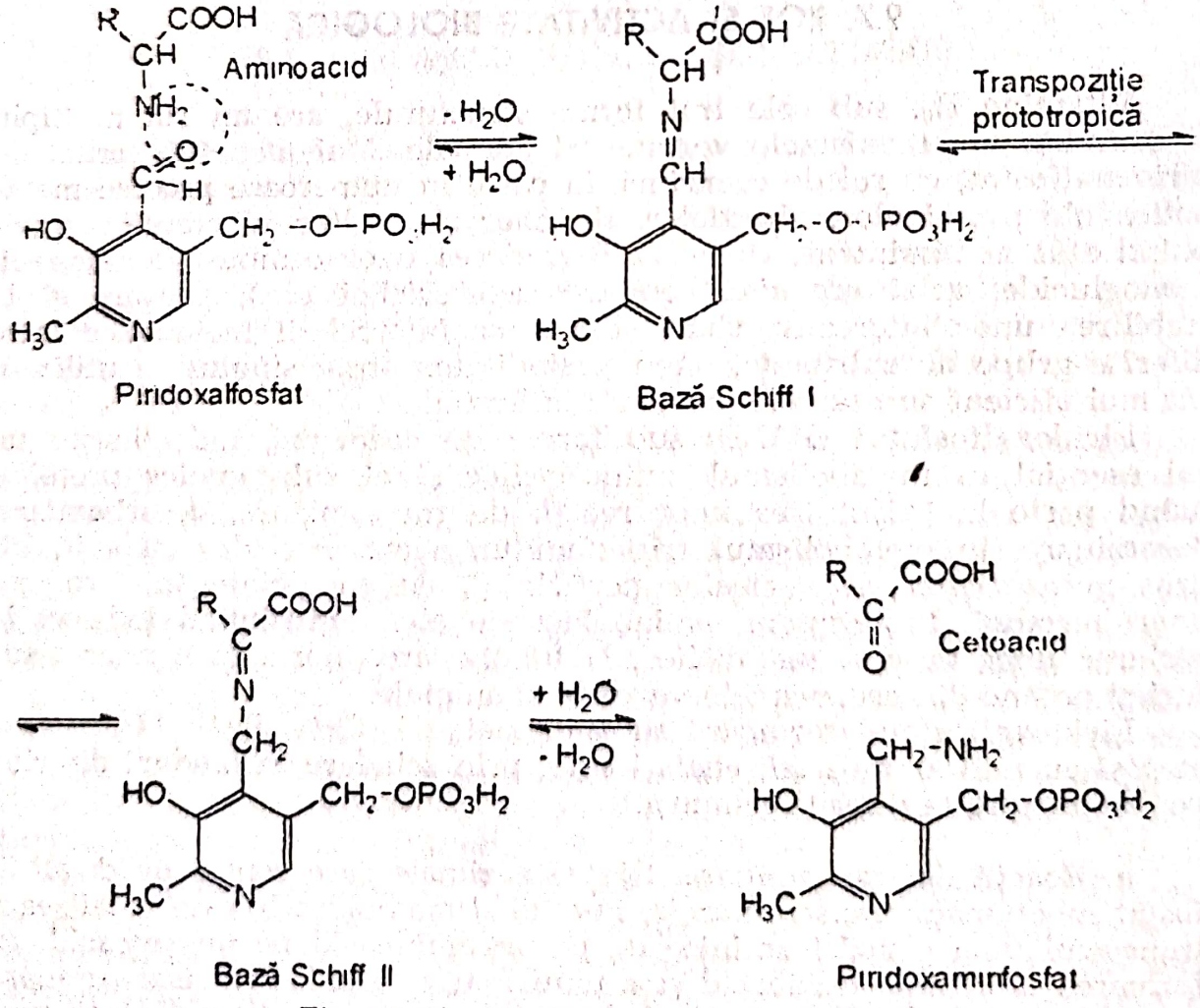
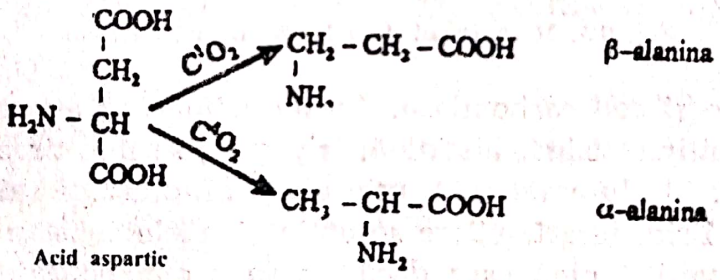


Fig. 9.4. Mecanismul transformării aminoacizilor

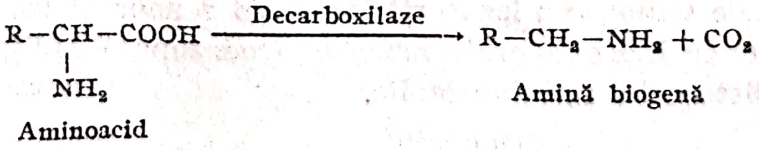
Transformarea aminoacizilor în cetoacizi se poate realiza concomitent printr-un şir de reacţii prin care cetoacizii se transformă în aminoacizi. Intermediar apar cele două baze Schiff, care prin transferul intramolecular al hidrogenului se transformă reciproc una în alta. Concomitent cu transformarea aminoacizilor în cetoacizi se realizează transformarea piridoxalfosfatului în piridoxaminfosfat şi invers, în cazul transformării cetoacizilor în aminoacizi. Reacţiile de transaminare sunt reacţii reversibile şi prin intermediul acestora se realizează în mare parte interrelaţiile metabolice dintre glucide şi protide. Cetoacizii provin prin metabolizarea glucidelor. Transaminarea reprezintă calea principală prin care se pot forma şi degrada toţi aminoacizii.

Reacţiile de transaminare, mai ales cele catalizate de glutamicooxalaceticotransaminaza (GOT), glutamicopiruvicotrasminaza (GPT) şi aspartpiruvicotransaminaza (APT) reprezintă interes în diagnosticul clinic. Activitatea lor scade în diferite afecţiuni metabolice, iar în stări de avitaminoză B_6 se reduce cu aproximativ 65%.

b. **Reacţii de decarboxilare.** Aminoacizii sub acţiunea unor aminoaciddecarboxilaze care conţin ca şi coenzimă piridoxilfosfat, elimină din molecula lor CO_2 şi formează amine biogene, dintre care unele au mare importanţă biochimică (histamina, serotonina, triptamina, tiramina, feniletilamina etc.) sau se transformă în noi aminoacizi. Din acidul aspartic se poate forma atât α-alanina, cât şi β-alanina în funcţie de gruparea carboxilică transformată în CO_2:



Reacţia generală de decarboxilare a aminoacizilor se prezintă astfel:



Unele amine biogene au proprietăţi farmacologice, altele sunt precursori ai unor compuşi heterociclici a unor hormoni şi fitohormoni. Piridoxalfosfatul participă activ în procesul de decarboxilare, conform mecanismului prezentat în figura 9.5.

În procesul de decarboxilare a aminoacizilor piridoxalfosfatul se reface şi nu trece în piridoxaminfosfat, ca şi în cazul reacţiilor de transaminare. Piridoxalfosfatul din molecula aminoaciddecarboxilazelor

Scanned with OKEN Scanner

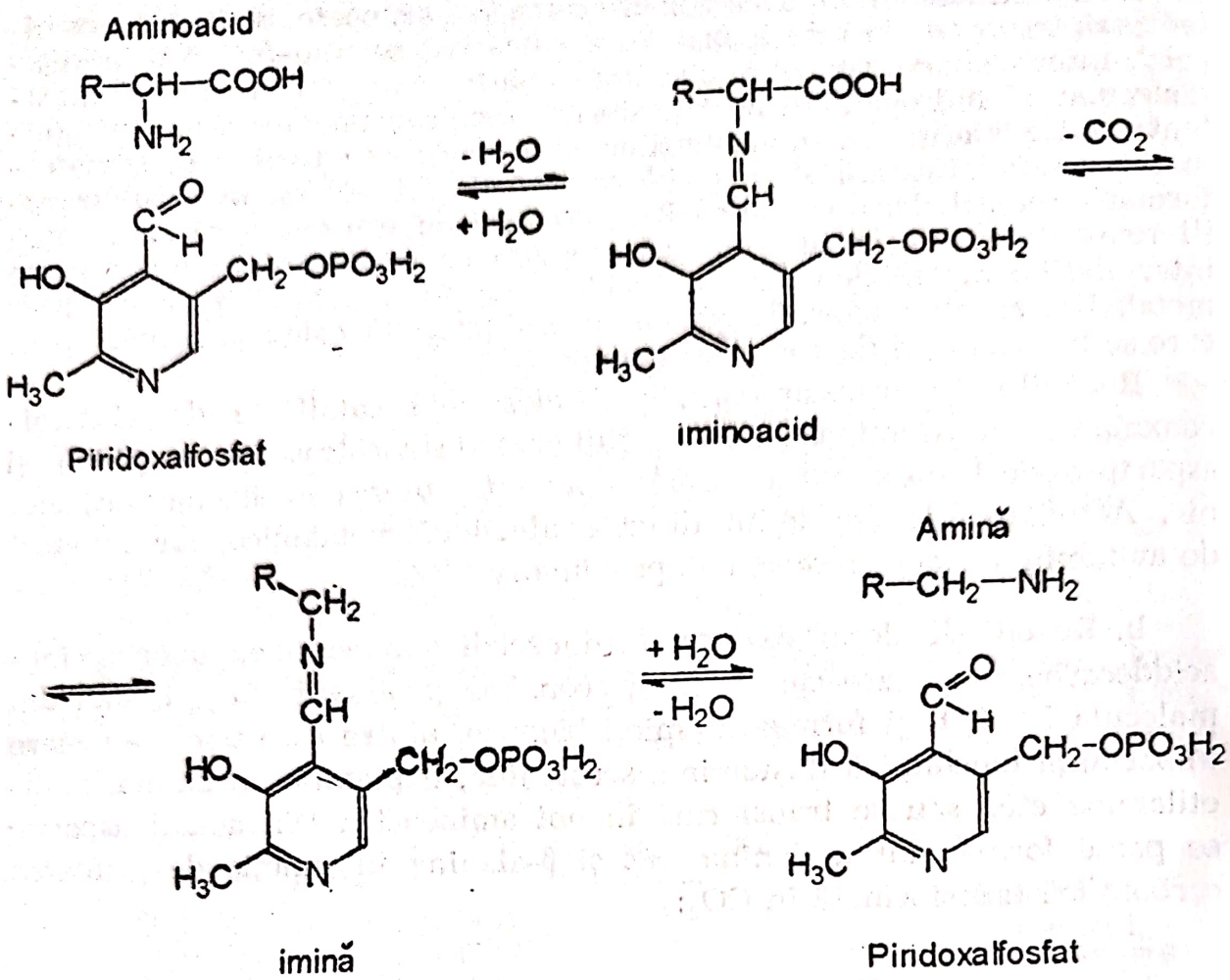
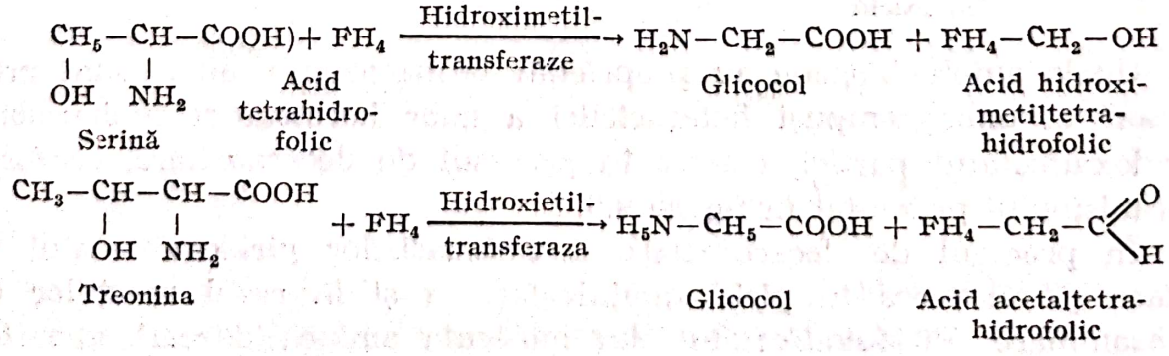


Fig. 9.5. Mecanismul decarboxilării aminoacizilor

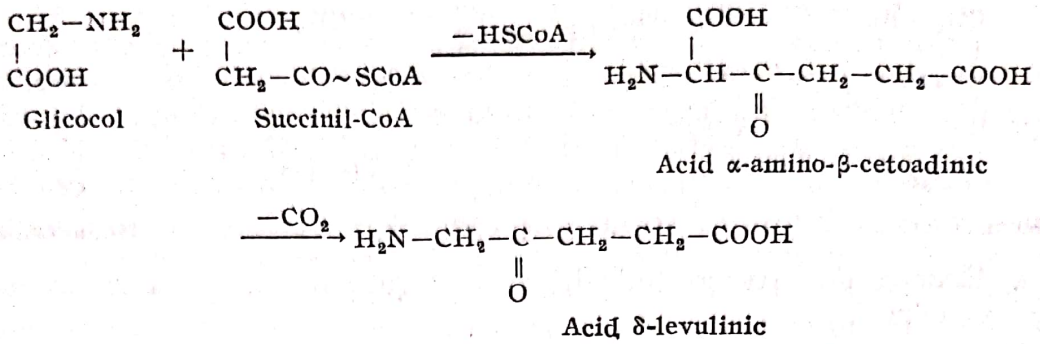
se mai numește și codecarboxilază. Acesta acționează asupra a numeroși aminoacizi (ornitină, lizină, histidină, triptofan, serină, tirozină, arginină, acid aspartic, acid glutamic etc.), precum și asupra 3,4-dihidroxifenilalaninei (DOPA). Prin decarboxilare se obțin și unele substanțe toxice (putresceină, cadaverină etc.) care dacă nu sunt metabolizate pot provoca diferite afecțiuni.

c. **Reacții de scindare** a legăturii Cα — Cβ a unor hidroxiaminoacizi, sub acțiunea unor hidroximetiltransferaze (coenzimă PALP), care necesită prezența sistemului tetrahidrofolic.



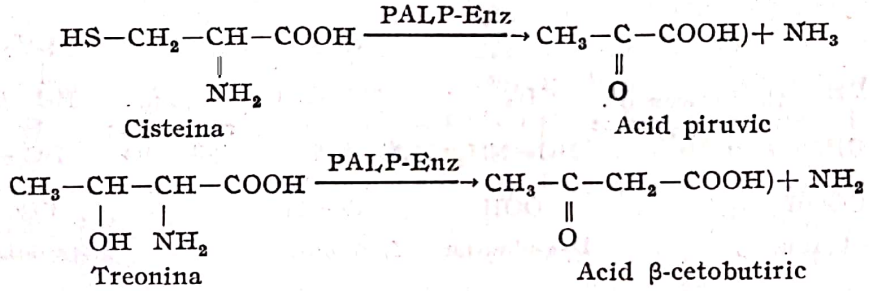
Scanned with OKEN Scanner

Printr-un mecanism similar PALP contribuie la condensarea glicocolului cu succinil-CoA cu formarea acidului δ-aminolevulinic, care este precursorul nucleelor porfirinice.



d. **Reacții de eliminare** a substituienților de la carbonul β și a hidrogenului de la carbonul α.

Triptofanul sub acțiunea triptofanazei (PALP) se poate transforma în indol, acid piruvic și NH_3 (fig. 9.6). Produsul rezultat prin β-scindare suferă ulterior un proces de dezaminare. Același tip de reacție stă la baza transformării β-tioaminoacizilor și β-hidoxiaminoacizilor în cetoacizii corespunzători. Metabolizarea cisteinei și a treoninei prin acest mecanism se realizează astfel:



Triptofansintetaza, care conține piridoxalfosfat, catalizează reacții inverse scindării în care produsul rezultat prin β-scindarea triptofanului se combină cu alt compus. Este cazul reacției serinei cu indolul, cu formare de triptofan (fig. 9.7).

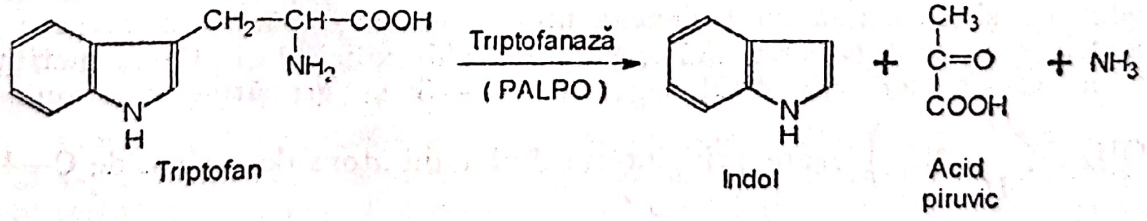


Fig. 9.6. Transformarea triptofanului în indol.

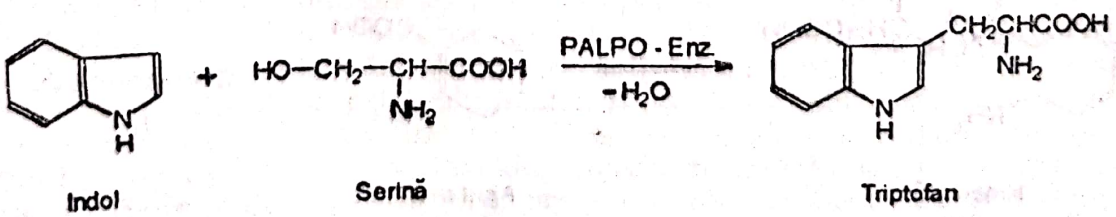
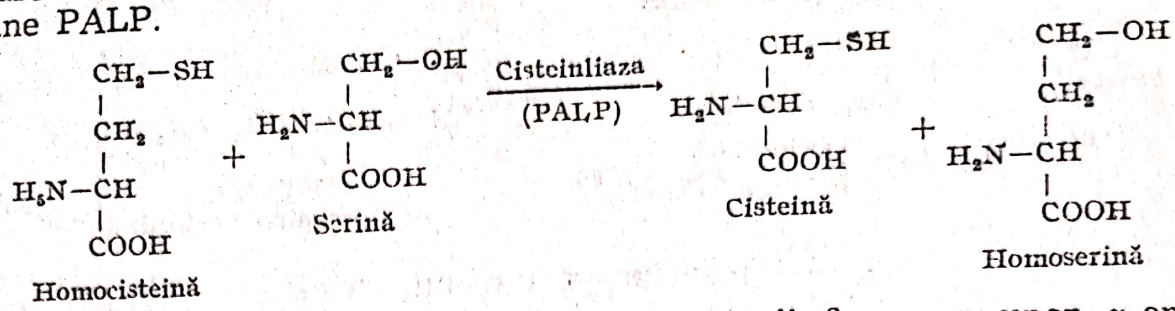


Fig. 9.7. Formarea triptofanului din indol și serină

Scanned with OKEN Scanner

Printr-un mecanism similar se realizează un proces de transsulfurare de la homocisteină la serină sub acțiunea cisteinliazei care conține PALP.

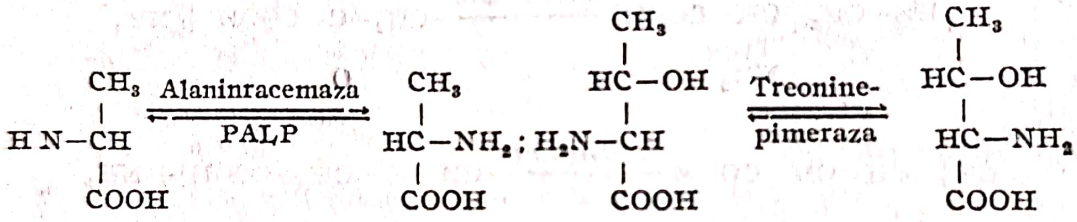


Homocisteină — Serină — Cisteină — Homoserină

e. **Reacții de clivare hidrolitică** a legăturii β-, γ- a unor α-amino-γ-cetoacizi

Prin acest mecanism se realizează scindarea hidrolitică a kinureninei metabolit care rezultă în cursul degradării triptofanului la acid antranilic și alanină (fig. 9.8). Printr-un mecanism similar hidroxikinurenina se transformă în acid hidroaxiantranilic. Dereglările care apar în metabolizarea triptofanului explică creșterea excreției de acid xantureic la cobai și șobolani în avitaminoza B_6. Dereglarea metabolismului triptofanului este un fenomen precoce care apare în stări de avitaminoză B_6.

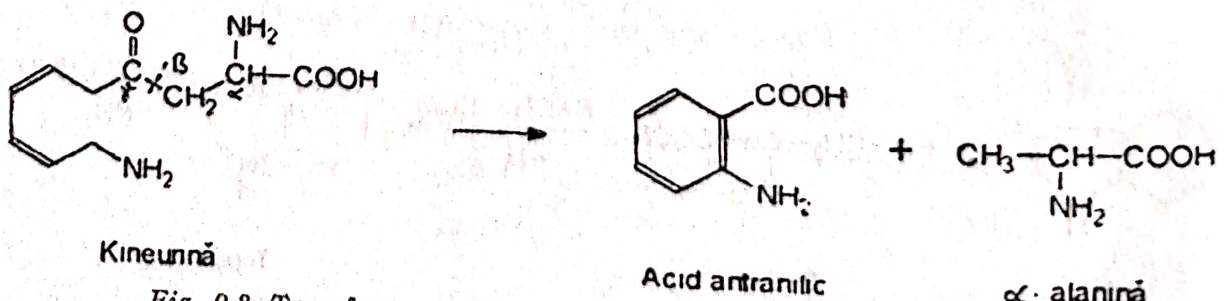
f. **Reacții de racemizare și epimerizare** a unor aminoacizi (alanină, treonină etc.)



L-α-alanina — D-α-alanina — L-treonina — D-treonina

În metabolismul glucidelor, vitamina B_6 intervine prin intermediul fosforilazei, care conține piridoxalfosfat, enzimă care determină scindarea fosforolitică a amidonului, glicogenului și a altor poliglucide.

Vitamina B_6 contribuie la biosinteza sfingozinei, participând astfe și la metabolismul lipidelor. Sistemele enzimatice care conțin piridoxa fosfat ca și coenzimă sunt dependente de anumite părți din structur acesteia cum sunt N-heterociclic, gruparea hidroxilică de la C—3, metilu de la C—2, hidroximetilul legat de C—5 și grupările funcționale $\left(OH, C\begin{matrix}O\\H\end{matrix}, NH_2\right)$ legate prin intermediul unui atom de carbon de C—4



Kineurină — Acid antranilic — α-alanină

Fig. 9.8. Transformarea kineurinei în acid antranilic și α-alanină

Prin metilarea hidroxilului de la C—3, compusul format nu mai poate funcționa ca și coenzimă.

Se poate concluziona că vitamina B_6, prin intermediul piridoxalfosfatului cu rol de coenzimă, ia parte activă în reacțiile de transaminare, decarboxilare și dezaminare a aminoacizilor, de sinteză și degradare a triptofanului, scindarea unor legături α-, β- și γ- a unor hidroxiaminoacizi, tioaminoacizi și de sinteză a acestora, formarea acidului δ-levulinic etc. Vitamina B_6 participă în metabolismul glucidic și lipidic, având cu adevărat un rol multiplu și complex în organism.

Vitamina B_6 în stare liberă sau sub formă de esteri fosforici, participă în organism de asemenea la producerea de anticorpi, formarea eritrocitelor, absorbția vitaminei B_{12}, biosinteza acizilor nucleici, menținerea echilibrului ionic, funcționarea normală a sistemului nervos și a celui muscular.

9.8. HIPOVITAMINOZE ȘI HIPERVITAMINOZE

La oameni nu s-a semnalat o avitaminoză B_6 certă din cauza abundenței alimentare și biosintezei acestei vitamine de către flora intestinală. În cazuri experimentale, în dereglări ale absorbției, în afecțiuni hepatice și intestinale care inhibă biosinteza, apare starea de avitaminoză, care se manifestă printr-o stare de nervozitate, insomnii, tulburări de mers, dureri abdominale, afecțiuni dermice, conjunctivite, anemii etc. Apar leziuni cutanate eritematoase și seboreice în jurul nasului, gurii și ochilor. Stări carențiale în piridoxină s-au observat mai frecvent la femeile gravide, datorită probabil necesităților mari de vitamină ale fetusului, precum și la cele care folosesc contraceptive pe cale orală.

Pentru depistarea stărilor de hipovitaminoză B_6 s-a introdus „testul triptofan", care constă în administrarea a 100 mg L-triptofan per kg corp și măsurarea acidului xantureic eliminat prin urină în 24 de ore. La omul sănătos trebuie să se elimine sub 30 mg/24 de ore de acid xantureic. Cantități mai mari de acid indică o stare de hipovitaminoză B_6. Acest test presupune absorbția integrală a piridoxinei administrate oral. Creșterea în urină a acidului xantureic și a acidului hidroxikinureic după administrarea de triptofan, denotă că transformarea acestui aminoacid în acid nicotinic este blocată de hidroxilaza kinureică, a cărei activitate este dependentă de PALP.

Starea de hipovitaminoză poate fi apreciată și după cantitatea de acid 4-piridoxic eliminat prin urină în 24 de ore. La omul adult sănătos, cantitatea de acid 4-piridoxic variază între 0,06 și 1 μmol/kg corp greutate în 24 de ore. La noii născuți rata excreției este de două ori mai mare. Starea de avitaminoză B_6 se poate aprecia și prin determinarea activității glutamatoxalaceticotransaminazei (GOT) „in vitro", sub acțiunea piridoxalfosfatului. În stări carențiale activitatea transaminazelor scade mult și este stimulată prin administrarea de piridoxalfosfat. Un coeficient de 1,70 (și peste) privind activitatea transaminazelor indică o stare carențială de piridoxină. În stări de hipovitaminoză B_6 scade și concentrația piridoxalfosfatului din corp, ori s-a stabilit că acest compus îndeplinește rolul de coenzimă în multe enzime, care au un rol central în

Scanned with OKEN Scanner

metabolismul proteic. În metabolismul cerebral, piridoxalfosfatul (PALP) are un rol cheie în producerea aminelor necesare pentru transmiterea stimulilor sinaptici cum sunt epinefrina, norepinefrina, tiramina, dihidroxifenilanina, serotonina, precum și în formarea acidului γ-aminobutiric (GABA), care funcționează ca reglator al activității neuronilor. Glutamatdecarboxilaza, care conține PALP ca și coenzimă, se găsește în cantitate mare în sistemul nerovos central, mai ales în substanța cenușie.

$$\underset{\text{Acid glutamic}}{HOOC-(CH_2)_2-\underset{\displaystyle COOH}{\underset{|}{CH}}-NH_2} \xrightarrow[PALP]{\text{Glutamatdecarboxilaza}} \underset{\text{Acid γ-aminobutiric}}{HOOC-(CH_2)_2-CH_2-NH_2} + CO_2$$

În hipovitaminoză piridoxinică nu se formează suficientă glutamatdecarboxilază și în consecință nici suficient acid γ-aminobutiric, care are un rol însemnat în funcționarea neuronilor și în transmiterea impulsului nervos la țesuturi. Prin faptul că afecțiunile nervoase care apar în avitaminoza B_6 pot fi vindecate prin administrarea de acid γ-aminobutiric, indică drept cauză principală a acestor afecțiuni scăderea activității glutamatdecarboxilazei.

La copiii mici hrăniți exclusiv cu lapte fiert și cu alimente autoclavate la temperaturi ridicate, se înregistrează cazuri (3—5 copii din 1000) de convulsii epileptiforme, hiperexcitabilitate, alterări ale encefalogramei datorate în principal deficitului în glutamatdecarboxilază, ce are consecință scăderea conținutului acidului γ-aminobuțiric.

În stări de hipovitaminoză piridoxică este afectat procesul de formare a compușilor porfirinici, inclusiv a hemoglobinei, fapt ce afectează hematopoieza și instalarea anemiei. La om apare o anemie microcitară hipocromă reversibilă, cu conținut ridicat de fier plasmatic, a cărui exces se depozitează în sideroblaste. Piracinele, care sunt metaboliți ai piridoxinei, au efect antianemic.

Prin administrarea unor antivitamine B_6 cum este dezoxipiridoxina sau hidrazida acidului izonicotinic (HIN), apar accidente nervoase (sindrom maniaco-depresiv, polinevrite, parestezii etc.), leziuni cutanante, eritemoseboreice mai ales în jurul nasului, ochilor și gurii, alterări ale limbii cu îngroșarea și înroșirea acesteia, amorțeli ale extremităților, slăbire și dureri musculare. Apare de asemenea hiperoxaluria, cu formarea calculilor de oxalat de calciu. Adăugarea de piridoxină și ioni de magneziu, determină o creștere a nivelului citraților renali care împreună cu Mg^{2+} contribuie la dizolvarea oxalaților.

Hidrazida acidului izonicotinic formează cu PALP un complex inactiv, care se elimină prin urină, diminuând în mod accentuat activitatea enzimelor dependente de PALP. Se apreciază că HIN crește de 10—20 de ori necesitățile în vitamina B_6, prin efectul de antivitamină (complex PALP—HIN inactiv enzimatic) și prin creșterea excreției urinare a piridoxinei și a metaboliților săi. În scopuri terapeutice trebuie acordată atenție sporită în stabilirea dozelor de HIN cu eficiență maximă și cu evitarea reacțiilor adverse.

În stări de avitaminoză B_6 scade rezistența organismului la infecții, iar activitatea fagocitară a leucocitelor polimorfonucleare scade propor-

Scanned with OKEN Scanner

țional cu deficitul de vitamină. În cavitatea bucală se dezvoltă *Lactobacillus acidophilus* în defavoarea speciei *L. casei*, favorizând astfel apariția cariilor dentare. Vitamina B_6 în doze de 1—2 mg/zi are rol protector pentru dentiție.

La șobolani, carența în vitamina B_6 se manifestă la început prin stagnarea creșterii, apoi apariția unei dermatite simetrice la nivelul nasului, urechilor, labelor, cozii numtiă „acordinia". Apar de asemenea eczeme, edeme, tumefacții, căderea părului, hemoragii, anemie etc. Scade capacitatea de convertire a glucozei și a aminoacizilor în lipide, fapt ce afectează biosinteza sfingolipidelor din sistemul nervos. Nivelul scăzut de sfingolipide din creier și activitatea redusă a glutamatdecarboxilazei, stau la baza apariției unor tulburări psihoneurologice cum sunt crizele epileptiforme, hiperexcitabilitate, convulsii spontane etc. Este afectată secreția de hormoni de către hipofiză, ovare, testicule. Scade conținutul hemoglobinei, diminuarea limfocitelor, apariția de hematurii. Efectele carenței de piridoxină asupra metabolismului proteic se caracterizează și prin creșterea excreției de oxalat, uree, acid xanturic, alantoină, creatinină etc., fiind accentuată oxidarea aminoacizilor. Scade activitatea transferazelor, conținutul coenzimei A din ficat și activitatea fosforilarelor în mușchi. Scade conținutul lipidelor totale din organism deoarece șobolanii avitaminizați nu pot biosintetiza lipide din glucide și aminoacizi. Dintre alte efecte ale vitaminozei B_6 fac parte creșterea în greutate și volum a unor organe (rinichi, ficat, glande suprarenale), hipertrofia și dilatarea inimii, leziuni miocordiale, diminuarea absorbției vitaminei B_{12} administrată oral.

La pisică, avitaminoza B_6 este însoțită de încetarea creșterii, anemie microcitară hipocromică, contracții convulsive, leziuni ale rinichilor.

La câine în stări de avitaminoză se produce înnegrirea limbii, anemie microcitară, tulburări nervoase, degenerescența grasă a ficatului, creșterea volumului unor organe (rinichi, inimă, tiroidă, suprarenale), tahicardie, fenomene de dispepsie etc.

La porumbei sunt mai accentuate afecțiunile degenerative ale nervilor periferici, care se manifestă prin convulsii de natură epileptică însoțite de anemie microcitară severă. Maimuța în stări de avitaminoză B_6 prezintă leziuni vasculare degenerative similare omului, alopecie, anemie etc.

La porc în avitaminoza B_6 este mai accentuată încetarea creșterii, afecțiunile nervoase și anemie. La puiul de găină nu apar afecțiuni dermice, dar încetează creșterea și apar convulsii puternice, care determină moartea puilor.

Adaosul de vitamină B_6 în alimente se utilizează pentru creșterea producției de lapte, ouă, carne, obținerea unor proteine de valoare ridicată, stimularea reproducerii, mărirea rezistenței organismelor la infecții etc.

Hipervitaminoze. Nu s-au semnalat simptome ale hipervitaminozei B_6 la om și nici la animalele furajate rațional. Toxicitatea celor trei vitamere ale piridoxinei (piridoxal, piridoxină și piridoxamină) este forate mică. Șobolanii, iepurii, câinii tolerează doze de 1 g de clorhidrat de piridoxol/kg greutate corp fără efecte determinante. Numai dozele foarte mari, de mii de ori peste necesități determină la animale mers confuz

Scanned with OKEN Scanner

și convulsii de origine toxică. Toxicitatea cronică a fost studiată la șobolani, câini, maimuțe, iepuri etc., cărora li s-a administrat câte 10 mg/kg corp piridoxină, timp de 3 luni, fără să apară modificări sanguine sau de greutate a corpului. Dozele de 20 mg/kg corp nu provoacă nici o tulburare la pisică, iar șobolanii suportă 100 mg/kg corp timp de două săptămâni, fără nici o tulburare.

Doza de toxicitate acută (DL_{50}) de clorhidrat de piridoxol, exprimată în mg/kg corp, administrată oral la șoareci, este de 8400 și de 1020 mg/kg corp dată prin injecții intravenoase. La șobolan, doza toxică dată oral variază între 5500—15900, iar cea dată intravenos este de 1450 mg/kg corp. Pentru piridoxal-5-fosfat doza toxică la șoarece dată oral este de 2000, iar cea dată intravenos este de 580 mg/kg corp.

La om, doze mari de 200—300 mg/kg corp, injectate intravenos, exercită o acțiune sedativă. La animalele aflate în hipovitaminoză dozele mari de vitamină B_6 înlătură crizele epileptiforme.

Dozele de 30—50 mg/zi la om, date pe perioade mai îndelungate, determină apariția crampelor musculare și poliurie, care se pot atribui hipervitaminozei B_6.

9.9. INTERRELAȚII VITAMINICE

Dozele mari de piridoxină inhibă activitatea fosfokinazelor implicate în formarea tiaminpirofosfatului (TPP), iar excesul de tiamină inhibă fosforilarea piridoxalului și implicit formarea de PALP. Dozele mari de vitamină B_6 determină o inhibare a absorbției intestinale a vitaminei B_1, iar tiamina aflată în exces scade activitatea transaminazelor și determină apariția acrodiniei la șobolan. Acest antagonism între vitaminele B_1 și B_6 apare numai atunci când una dintre aceste vitamine se găsește în exces față de cealaltă, datorită competiției pentru fosforilarea acestora, pentru transformarea lor în coenzime active.

În avitaminoza B_6 se produce o creștere a conținutului vitaminei B_2 în ficat la șobolani, scăderea HS—CoA și a acidului pantotenic din mușchi, precum și a vitaminelor B_{12}, și PP din ficat și ser.

Cu toate că acidul glutamic intră în constituția acidului folic, acesta din urmă se comportă în unele procese metabolice sub acțiunea transaminazelor (GAGA) ca și antimetabolit.

Prin cercetarea tumorilor experimentale s-a observat existența unui antagonism între vitaminele B_6 și B_2. Creșterea tumorilor este stimulată de prezența vitaminei B_6 dar numai în absența vitaminei B_2.

9.10. ANALOGI STRUCTURALI ȘI ANTIVITAMINE

Antivitaminele B_6 s-au folosit inițial pentru a produce stări de avitaminoză, a se cunoaște simptomele care apar în asemenea stări carențiale și de a se determina mecanismul de acțiune a celor trei vitamine B_6 (piridoxol, piridoxal, piridoxamină).

Dintre analogii structurali ai piridoxinei, obținuți prin sinteză cu activitate biologică similară piridoxinei la șobolani, ciuperci *(Ceratos*

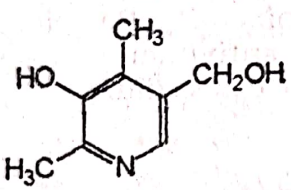
Scanned with OKEN Scanner

tomellaumi), bacterii *(Streptococcus faecalis, Lactobacillus casei),* drojdii *(Saccharomices oviformis),* fac parte piridoxin-4,5-diacetatul și 3,4,5-piridoxintriacetatul. Tripalmitatul și trilinoleatul de piridoxină sunt active numai asupra șobolanilor și se depun sub formă de esteri, iar izopiridoxina are o ușoară activitate biologică stimulând creștereae bacteriei *Streptococcus plantarum.*

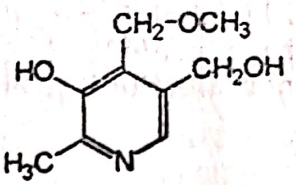
Majoritatea analogilor structurali ai vitaminei B_6 naturali sau obținuți prin sinteză au acțiune antivitaminică, inhibând creșterea organismelor tinere, dezvoltarea culturilor de microorganisme, perturbând metabolismul triptofanului, activitatea transferazelor, decarboxilazelor și a altor enzime care au ca și coenzimă PALP.

Dintre cele mai importante antivitamine B_6 fac parte deoxipiridoxina (I), metoxipiridoxina (II), toxopirimidinfosfatul (III), etilpiridoxina (IV), aminopiridoxina (V), hidrazida acidului nicotinic (HIN) (VI), tocopirimidina (VII), 5-dezoxipiridoxal (VIII) etc.

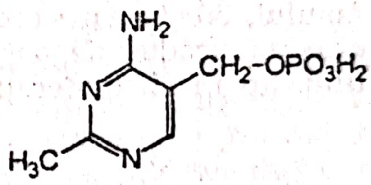
Dezoxipiridoxina inhibă creșterea puilor de găină, fiind un antagonist puternic al vitaminei B_6. Derivatul său fosforilat este un anta-



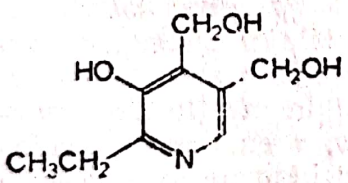
Dehidroxipiridoxină
(I)



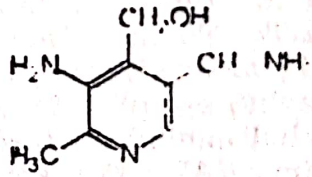
Metoxipiridoxină
(II)



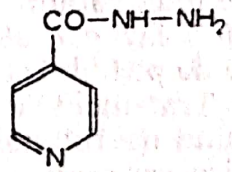
Toxoaminopirimidinfosfat
(III)



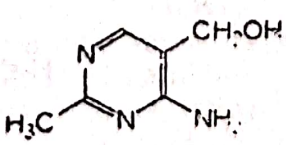
Etilpiridoxină
(IV)



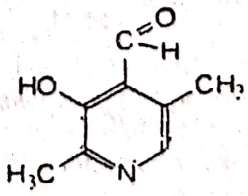
Aminopiridoxină
(V)



Izonicotinhidrazidă (HIN)
(VI)



Toxopirimidină
(VII)



5 - dehidroxipiridoxal
(VIII)

Fig. 9.9. Antivitamine B_6 puternice

gonist enzimatic. Toxopirimidinfosfatul este antagonist cu piridoxalfosfatul într-o serie de reacții, în special asupra tirozindecarboxilazei, datorită analogiei structurale dintre cei doi componenți.

Toxopirimidina se formează în organism prin scindarea tiaminei. Administrarea sa la animale le provoacă crize epileptiforme. Manifestă efecte inhibitoare asupra glutamatdecarboxilazei din creier și asupra unor transaminaze din celulele animale și din bacterii.

Activitatea antivitaminică mai slabă au compușii 3-hidroxi-4-hidroximetil-2-metilpiridina (a), 3-amino-5-aminometil-4-etoximetil-2-etilpiridina (b), 3-hidroxi-2,4,5-trimetilpiridina (c) (fig. 9.10).

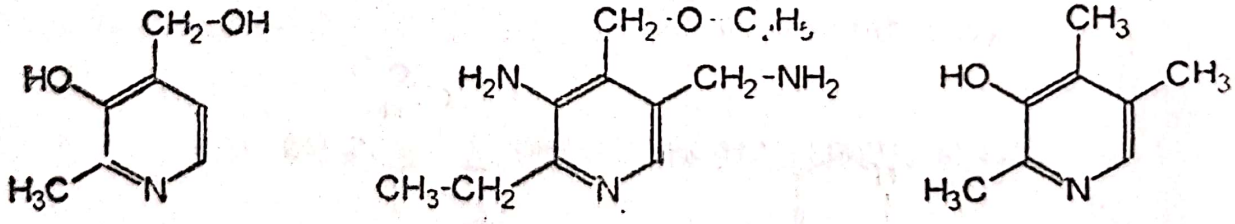
Tot în această categorie se încadrează semicarbazida, hidroxilamina și compușii lor de condensare (piridoxaloxima, piridoxalsemi-carbazona etc.), care inhibă piridoxalkinazele, precum și inhibitori de substrat ca D-cicloserina, izooxazolidona, cicloalanina, izomerii cicloglutamatului etc.

Administrarea incorectă a izonicotinhidrazinei (agent antituberculos) în tratamentul tuberculozei, poate determina apariția unor nevrite. De asemenea tratamentele frecvente cu penicilamină determină creșterea eliminării piroxinei din organism și tulburarea metabolismului triptofanului, efecte care cedează la administrarea vitaminei B_6. Penicilamina este un produs de degradare a penicilinei. Unele antivitamine B_6 sunt utilizate în chemoterapia unor afecțiuni și chiar a cancerului.

9.11. INDICAȚII TERAPEUTICE ȘI PRODUSE FARMACEUTICE

Pentru tratamentele profilactice și curative vitamina B_6 se găsește în farmacii sub formă de tablete și fiole. Tabletele conțin în general 25, 50, 100 și 300 mg, iar fiolele 50, 100 și 300 mg de piridoxină. Dozele administrate la bolnavi depind de felul și gravitatea afecțiunii. Pe cale parentală se administrează la adulți între 25 și 150 mg zilnic date fracționat, iar pe cale orală 200—300 mg piridoxină zilnic. La sugari dozele de piridoxină date zilnic variază între 2 și 10 mg.

Tratamentele cu piridoxină se aplică în special în afecțiunile determinate de tulburarea metabolismului aminoacizilor, a enzimelor piridoxinice care au ca și coenzimă PALP și a aminelor biogene. Necesitățile pentru piridoxină cresc la femeile gravide și se apreciază că aproximativ 50% din femeile gravide suferă de deficiență piridoxinică fapt ce afectează starea de sănătate a fetușilor, în special activitatea sistemului



5 - dehidroximetil - - piridoxină (a)

3 - amino - 2 - etil - 4 - etoximetil - - 5 - metilaminopiridină (b)

3 - hidroxi - 2,4,5 - trimetilpiridină (c)

Fig. 9.10. Antivitamine B_6 mai slabe

Scanned with OKEN Scanner

nervos. În asemenea cazuri de hipovitaminoză B_6 unii copii devin retardați mintal. Mai recent s-a stabilit că tratarea convulsiilor care apar în stări de avitaminoză devine eficientă numai prin administrarea unor doze mari de 500 mg/zi de clorhidrat de piridoxol. La fel, doze mari de piridoxină se vor aplica în stări anemice și în cazul perturbării metabolismului aminoacizilor și a enzimelor PALP dependente. Trebuie acordată o mare atenție în tratamentele care se fac cu agenți chemoterapeutici cum sunt hidrazida acidului izonicotinic, penicilamina, D-cicloserina etc., care au acțiune antivitaminică B_6 și pot provoca apariția de polinevrite, paralizii, convulsii cerebrale. Aceste afecțiuni pot fi prevenite prin administrarea unor doze de 30 la 100 mg/zi de clorhidrat de piridoxol. Doze de 25—40 mg clorhidrat de piridoxol se vor aplica femeilor care folosesc contraceptive administrate oral, care dereglează metabolismul piridoxinei și a unor enzime ce conțin PALP, evidențiate prin creșterea excreției urinare de acid xantureic, după administrarea de triptofan, precum și prin reducerea activității enzimelor eritrocitare dependente de PALP. Dereglarea metabolismului piridoxinei determină apariția unor stări depresive și inhibarea ovulației la femei. Tratamente cu vitamina B_6 se vor face femeilor gravide cu vomitări dese, datorită dereglării metabolismului acestei vitamine și bolnavilor care fac terapie cu radiații care induc o dereglare accentuată a proteinelor și scăderea conținutului de piridoxină. Vitamina B_6 este un important agent antivitaminic care se administrează femeilor gravide pentru a împiedica apariția unor compuși toxici (intoxicație internă) cu efecte negative grave asupra fetusului. Vitamina B_6 stimulează eliminarea apei care apare în edeme, inclusiv în sindromul premenstrual, vindecă depresiile psihice, convulsiile care apar în stările de hipovitaminoză și reface flora intestinală dereglată de utilizarea contraceptivelor orale și a tratamentelor antimicrobiene.

În deficiența genetică a piridoxinei, cu apariția anemiei și a dereglării metabolismului aminoacizilor se vor aplica bolnavilor zilnic doze de clorhidrat de piridoxol cuprinse între 40 și 200 mg. Vitamina B_6 se administrează și diabeticilor pentru toleranța organismului față de glucoză și scăderea conținutului acesteia, precum și bolnavilor cu astmă.

Preparatele cu piridoxină sunt recomandate în boli cardiace (infract, insuficiență cardiacă etc.), în hipertensiune arterială, arterioscleroză, dureri musculare, anemie macrocitară, în dereglări neurologice și psihice (insomnii, epilepsie, paraplegie spastică, encefalită, astenie nervoasă), în dermatite, glosită, keiloză, hepatită epidemică, în pelagră în asociere cu vitaminele PP și B_2, în polinevrite toxice și medicamentoase, în boli de iradiație, în administrarea per os a antibioticelor și sulfamidelor cu spectru larg de acțiune, în tuberculoză și terapia cu hidrazida acidului izonicotinic etc.

Dintre preparatele farmaceutice care conțin numai vitamina B_6, sub formă de tablete, drajeuri și fiole face parte medicamentul „Benadon", produs de Hoffmann — La Roche. Tabletele și drajeurile acestui produs conțin 40, 300 mg, iar fiolele 100, 300 mg vitamina B_6.

Vitamina B_6 este inclusă în numeroase preparate farmaceutice ce conțin „complex B" sau polivitamine precum și pentru îmbogățirea unor alimente (produse de patiserie, pâine, lapte), tonice și dietetice.

Scanned with OKEN Scanner

Capitolul 10. VITAMINA B_{12}

10.1 Scurt istoric 251
10.2. Structura moleculară 252
10.3. Obţinere şi proprietăţi 256
10.4. Metode de identificare şi dozare 258
10.5. Răspândire şi necesităţi 259
10.6. Absorbţie, transport şi excreţie 260
10.7. Rol şi acţiune biochimică 264
10.8. Hipovitaminoze şi hipervitaminoze 269
10.9. Interrelaţii vitaminice 272
10.10. Antivitamine 273
10.11. Aspecte terapeutice şi farmacologice 274

Vitamina B_{12} este indispensabilă pentru viaţa omului şi a animalelor. Ea are o importanţă deosebită în ce priveşte creşterea, hematopoieza şi funcţionarea celulei nervoase. Reprezintă un factor de creştere pentru numeroase microorganisme. Denumirea de *cianocobamidă* derivă din structura sa moleculară întrucât conţine gruparea cian (-C≡N), un atom de cobalt şi grupări amidice. Se mai numeşte şi *cianocobalamina, antianemica, vitamina antipernicioasă, corinoidă, factor antipernicios, factor anemic extrinsec, factorul proteinelor la animale* etc. Denumirea de corinoidă provine de la inelul porfirinic modificat din molecula sa numit *inel corinic.* Numele de cianocobalamină nu este riguros ştiinţific deoarece nu conţine grupare aminică liberă sau legată de nucleul central (corinic), nici de atomul de cobalt şi nici de ribonucleotidă, ci numai în componenţa grupărilor amidice, fapt pentru care este mai corectă denumirea de cianocobamidă decât cea de cianocobalamină. Identificarea, izolarea, stabilirea structurii şi a activităţii biologice a vitaminei B_{12} a necesitat colaborarea dintre mai multe grupe de specialişti (chimişti, fiziceni, matematicieni, biologi, biochimişti, medici, farmacişti etc.) o perioadă mai îndelungată, reuşindu-se în cele dn urmă obţinerea acestei importante vitamine pe cale industrială.

Scanned with OKEN Scanner

10.1. SCURT ISTORIC

Primul caz de anemie pernicioasă în relație cu dereglarea sistemului digestiv este semnalată în 1824 de către *Combe*. Mai târziu, în 1855, *Combe și Addison* descriu simptomele clinice ale anemiei pernicioase. Aceste simptome sunt confirmate ulterior, în 1868, de către *A. Biermer*. În 1922, *G.H. Whipple* remarcă efectul favorabil al ficatului crud în anemia câinelui. În 1926, medicii americani *G.R. Minot și W.P. Murphy* au descoperit că pacienții cu anemie pernicioasă se vindecau dacă erau hrăniți cu ficat crud de bovine. La începutul cercetărilor s-au administrata pacienților prin hrană cantități mari de ficat crud pe zi, câte 300—500 g, crezând că în ficat se află „factorul antipernicios", care readuce la normal tabloul sanguin al bolnavilor. Se fac ulterior numeroase cercetări clinice cu extracte de ficat cu acțiune antianemică. Cu toate eforturile depuse de a izola din ficat „factorul antipernicios", progresele au fost minore, deoarece boala nu putea fi provocată la animalele de experiență, cercetătorii fiind nevoiți să lucreze numai cu oameni care aveau anemie pernicioasă.

În perioada anilor 1920—1930 s-a constatat că animalele rumegătoare care pășteau pe terenuri sărace în cobalt, se îmbolnăveau grav și nu se vindecau decât prin adăugarea de cobalt în hrană.

În 1929, W.B. CASTLE afirmă că doi factori sunt implicați în controlul anemiei pernicioase; un „factor extrinsec", care se găsește în hrană, și un „factor intrinsec", care se găsește în secreția gastrică normală. Administrarea simultană a acestor factori influențează favorabil formarea globulelor roșii și dispariția treptată a simptomelor anemiei pernicioase. În 1930, *M. Gäusslen* obține extracte de ficat cu acțiune antianemică.

În *1934, G.H. Whipple, G.R. Minot* și *W.P. Murphy* obțin Premiul NOBEL în medicină, pentru activitatea și rezultatele obținute în tratarea anemiei pernicioase. *M. Shorb* reușește în perioada 1947—1948 să constate că factorul antipernicios „extrinsec" cu „factorul de creștere" la *Lactobacillus lactis* Dörner au aceeași activitate biologică. Tot acum se descoperă „factorul proteinelor animale", care stimulează creșterea animalelor domestice. În procedeele de extragere a factorului antipernicios „extrinsec" se folosește papaina activată cu cianuri, obținându-se un produs cristalin și stabil.

În 1948, două grupuri de cercetători, formate din *E.L. Smith* și *J. Parker* în Anglia și *R. Rickes* și *K. Folkers* în S.U.A., lucrând separat, reușesc să descopere un compus roșu cristalin, cu acțiune antipernicioasă, căruia îi dau numele de vitamina B_{12}. Stabilirea structurii moleculare a vitaminei B_{12} a fost o problemă de asemenea foarte grea, rezolvată integral în 1959, prin folosirea mai multor metode moderne de cercetare, inclusiv difracție cu raze X. *R. West* arată în 1948 că injecțiile cu vitamina B_{12} scad dramatic simptomele anemiei pernicioase și contribuie la vindecarea rapidă a bolnavilor.

În 1949, *J.V. Pierce* și colaboratorii săi reușesc să izoleze două forme cristaline de vitamină B_{12} cu același efect în vindecarea anemiei pernicioase. O formă conținea gruparea cian și s-a numit *cianocobalamină*, iar altă formă conținea gruparea hidroxil și s-a numit *hidroxicobalamină*. În perioada anilor 1948—1951 se reușește izolarea vitaminei B_{12}

Scanned with OKEN Scanner

pure din mediile de cultură ale speciilor *Streptomyces griseus, St. aurofaciens,* din mediul de cultură pentru obținerea neomicinei și din ficatul de bou.

În 1955 renumita cercetătoare *Dorothy C. Hodgkin* împreună cu grupul său de cercetare reușesc să stabilească structura moleculară a cianocobamidei și formele sale coenzimatice, folosind metoda cristalografiei cu raze X. Tot în 1955, *Eschenmoser* și colab. din Elveția, împreună cu *R.B. Woodward* din S.U.A., împreună cu colectivele lor, reușesc să izoleze vitamina B_{12} din culturile unor bacterii și ciuperci. În 1961, *P.G. Lehnert, D.C. Hodgkin* și numeroși alți cercetători reușesc să descopere coenzimele corinoide (B_{12}) și activitatea lor metabolică în diferite procese.

Sinteza chimică totală a vitaminei B_{12} a fost realizată în 1973 de către *R.B. Woodward* și colaboratorii săi.

10.2. STRUCTURA MOLECULARĂ

Așa după cum s-a menționat anterior, stabilirea structurii moleculare a vitaminei B_{12} s-a efectuat cu multă greutate, pe baza colaborării unor reputați cercetători din mai multe domenii de activitate, folosind diferite metode moderne de cercetare, o perioadă relativ îndelungată de timp, din 1948 și până în 1973, când s-a realizat sinteza chimică totală a acestei vitamine.

Vitamina B_{12} are formula moleculară $C_{68}H_{90}N_{14}O_{14}PCo$ și masa moleculară $1\,490 \pm 140$ în funcție de grupările funcționale legate de atomul de cobalt. Pe baza analizei compoziției chimice a vitaminei B_{12} s-a stabilit că în molecula acesteia se găsește un atom de Co (4,5%), un atom de P (2,43%), un număr egal de atomi de azot și de oxigen, precum și numeroși atomi de carbon și hidrogen, așa după cum reiese din formula menționată. Problema dificilă a fost stabilirea structurii moleculare, a configurației acesteia și a legăturilor dintre atomi.

Structura moleculară a vitaminei B_{12} (cianocobamida) se prezintă în figura 10.1.

Din punct devedere chimic vitamina B_{12} conține un nucleu porfirinic modificat numit nucleu corinic (fig. 10.2, a), o ribonucleotidă ce are ca bază azotată 5,6-dimetilbenzimidazolul (fig. 10,2, b) și aminopropanol ($H_2N-CH_2-\underset{\displaystyle OH}{\underset{|}{CH}}-CH_3$).

Nucleul cornic este un macrociclu tetrapirolic numit și etiocobalamină, derivat de la porfirină, format din patru nuclee pirolice (A, B, C, D) cu șase duble legături conjugate, aranjate diferit de cele din nucleul porfirinic al hemoglobinei. Ele formează un situs unic de rezonanță moleculară. Trei dintre aceste duble legături constituie punți metinice (-CH=) de legătură la trei nuclee pirolice. Inelele pirolice A și D se leagă în mod direct și nu printr-o punte metinică. Datorită acestei legături directe, nucleul corinic conține cu o punte metinică mai puțin (trei) decât nucleul porfirinic, care conține patru punți metinice.

Inelele pirolice din nucleul corinic conțin opt radicali metili fixați la atomii de carbon C-1, 2, 5, 7, 10, 12, 13, 17, trei resturi de acetamidă

Scanned with OKEN Scanner

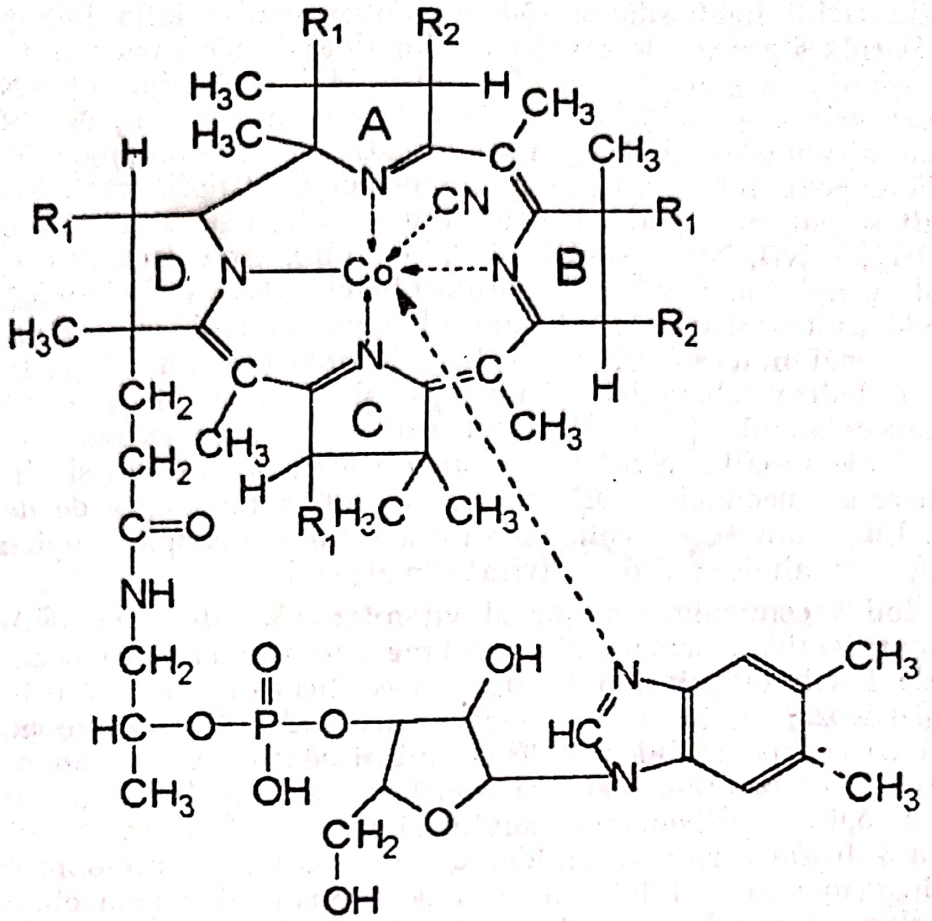


Fig. 10.1. Structura vitaminei B_{12} (cianocobamid)

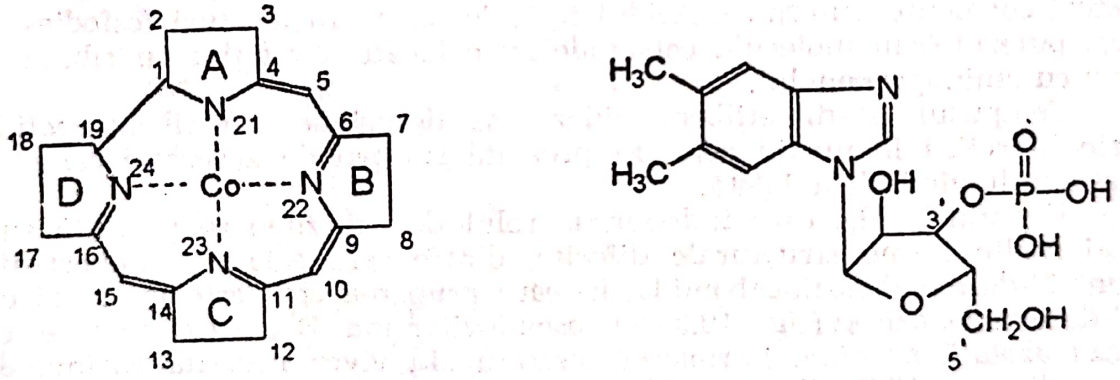


Fig. 10.2. Structura nucleului corinic și a ribonucleotidei din cobamide

la atomii C-2, C-7, C-18 și patru resturi de propanamidă la atomii C-3, C-8, C-13, C-17.

În centrul inelului tetrapirolic (corinic) se găsește un atom de Co trivalent hexacoordinat, fixat prin patru legături coordinative de atomii de azot ai inelelor pirolice (A, B, C, D) printr-o legătură coordinativă de

Scanned with OKEN Scanner

N—3 din ciclul imidazolic al 5,6-dimetilbenzimidazolului încorporat în ribonucleotidă și printr-o legătură (coordinativă) de gruparea cian (—C≡N), care îi conferă denumirea de cianocobamidă. Radicalul —C≡N a fost identificat prin spectru de absorbție în infraroșu. Atomul de cobalt din molecula cobamidelor fiind legat coordinativ de restul componentelor din moleculă nu poate fi înlocuit pe cale chimică cu Co^{60} radioactiv. De atomul de cobalt se pot lega și alte grupări funcționale, cum sunt cele de —OH sau $—OH_2^+$, —NO, NO_2, —SCN, Cl^-, Br^- etc., iar cobamidele care conțin aceste grupări se vor numi hidroxicobamidă (sau oxicobamidă), nitrozocobamidă, nitrocobamidă, sulfcianocobamidă, clorcobamidă etc. Nitrocobamida se mai numește vitamina B_{12c}, hidroxicobamida B_{12b}, iar forma anhidră a hidroxicobamidei se numește și vitamina B_{12a}. Hidroxicobamida, aquocobamida ($—OH_2^+$) și nitrocobamida s-au extras din mediile de cultură ale speciilor *Streptomyces aurofaciens, Str. griseus* și din mediile de obținere ale neomicinei. Ele reprezintă forme fiziologice de depozitare în ficat. Unele din aceste cobamide au activitate biologică similară cianocobamidei, iar altele au o activitate mai slabă.

Al doilea component major al vitaminei B_{12}, după nucleul corinic, este ribonucleotida, formată din 5,6-dimetilbenzimidazol ca bază azotată, legată de D-riboză printr-o legătură α-N-glicozidică și nu printr-o legătură β-glicozidică, ca și în celelalte nucleotide. Această ribonucleotidă se leagă de corină (inelul corinic cu substituenții metilici, amidici și cu ionul de cobalt) printr-o legătură coordinativă, care leagă atomul de Co de N-3 al 5,6-dimetilbenzimidazolului și printr-o legătură esterică între gruparea 3'-fosfat a ribonucleotidei și gruparea OH a aminopropanolului, care prin gruparea aminică s-a legat de propanamida prin eliminare de NH_3, închizând ciclul mare al vitaminei B_{12}. Aminopropanolul servește deci la unirea ribonucleotidei din ciclul tetrapirolic al vitaminei B_{12} prin intermediul propanamidei de la C-17 al inelului pirolic D, formând legături covalente puternice. Acidul fosforic formează legături fosfodiesterice puternice în molecula cobamidelor; o legătură estetică cu riboza și una cu aminopropanolul.

Compusul 5,6-dimetilbenzimidazol se desprinde din ribonucleotidă prin hidroliză în mediu acid. El prezintă spectru de absorbție caracteristic în lumină ultravioletă.

Vitaminele B_{12} care îndeplinesc rolul de coenzime se prezintă sub mai multe forme structurale diferite, dintre care cele mai importante sunt 5'-dezoxiadenozincobamida, în care gruparea cian este înlocuită cu 5'-dezoxiadenozina (fig. 10.3) și pseudovitamina B_{12}, care conține ca bază azotată adenina. Formarea acestora „in vivo" necesită enzima de adenolizare, ATP, flavinenzime și feredoxină. Vitaminele B_{12} conțin Co^{3+} (diamagnetic), iar unele enzime corinoide conțin Co^{2+} (paramagnetic).

Prin substituirea 5,6-dimetilbenzimidazolului cu compuși similari se obțin numeroși analogi structurali (fig. 10.4) cum sunt α-(5-hidroxibenzimidazoil)-cianocobamida sau vitamina B_{12}III sau factorul III (a); α-(2-metiladenil)-cianocobamida sau factorul A (b); cu adenina se formează pseudovitamina B_{12} (c); cu 2-metil-mercaptoadenina (d); guanincobamida (e); cu hiperxantina-sau-factorul G (f); cu 2-metil-hipoxantina sau factorul H (g); cu metilguanima (h), guanindifosfat etc. La acești analogi structurali legătura cu riboza se face la N-7, iar prin N-9 se leagă coor-

Scanned with OKEN Scanner

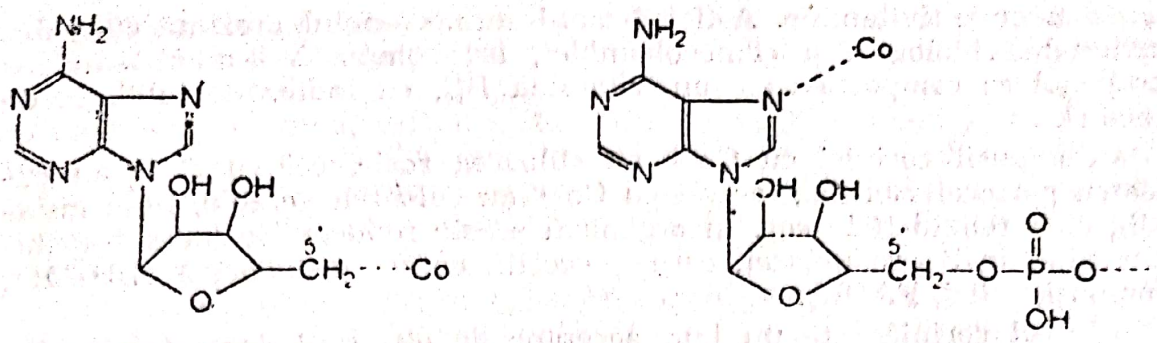
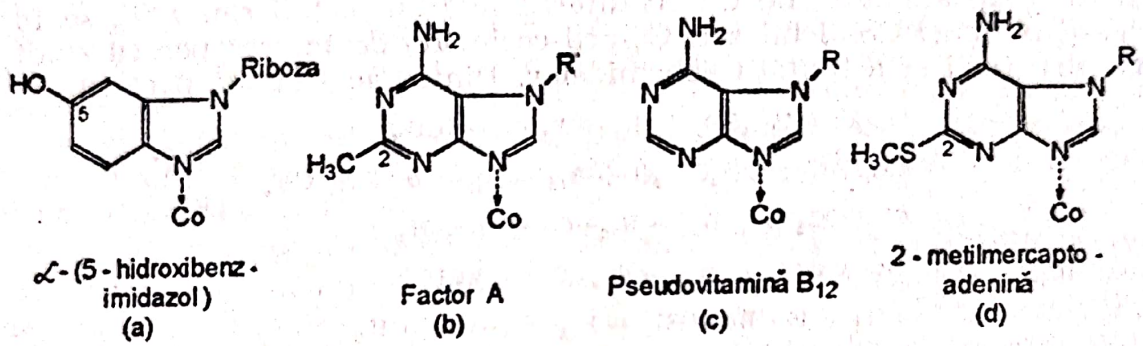
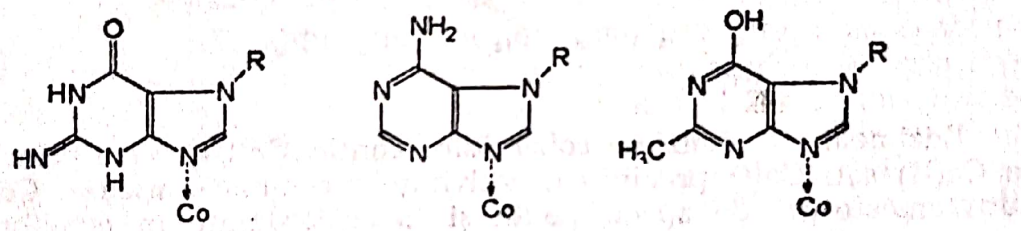


Fig. 10.3. Structura unor coenzime corinoidice





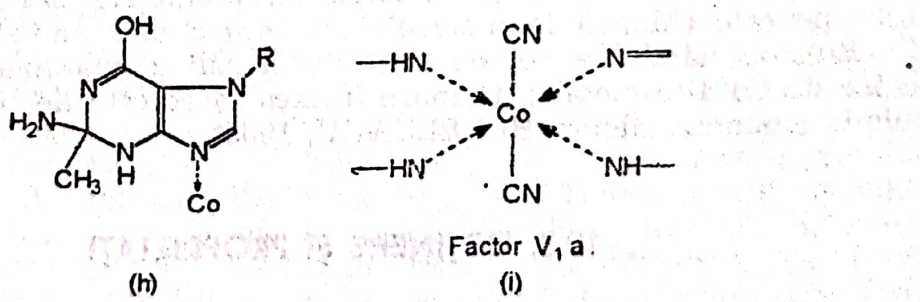


Fig. 10.4. Homologi structurali ai vitaminei B_{12}

dinativ cu cobaltul. Vitamina B_{12} fără ribonucleozidă se numește *Factorul b*, iar fără aminopropanol și 5,6-dimetilbenzimidazol, cu două grupări cian, reprezintă *Factorul* V, sau acidul dicianocobirinic-hexamidă (fig. 10.4).

Înlocuirea aminopropanolului cu omologi structurali sau izomeri ai acestuia determină formarea unor compuși cu activitate biologică redusă

Scanned with OKEN Scanner

sau a unor antivitamine. Astfel 1-metil-aminoetanolul prezintă 60% din activitatea biologică a cianocobamidei, iar compusul 2-metil-2-aminopropanol se comportă ca o antivitamină B_{12}, cu indice de inhibiție de 1500 : 1.

Compușii corinici cu Co^{3+} au culoarea roșie, cei cu Co^{2+} au culoarea portocalie-brună, iar cei cu Co^{1+} au culoarea verzuie, fiind instabili, ușor reoxidați la aer. În organism aceste reduceri se fac sub acțiunea vitamin-B_{12}-reductazei, care necesită ca și cofactori $NADH+H^+$, compuși tiolici, $FADH_2$.

Inelul corinic este un bun acceptor de electroni, iar vitamina B_{12} este primul compus natural cunoscut la care Co se leagă direct de atomul de carbon.

Dacă prin reacții chimice se substituie una din cele 6 legături coordinative ale atomului de Co cu diferiți radicali alchili sau arili, se formează compuși Co-alchil sau Co-aril-corinoide de interes pentru studierea structurii și activității cobamidelor. Dintre aceștia fac parte:

$$CH_3I;\ (CH_3)_2SO_4 + B_{12} \rightarrow B_{12}-Co-CH_3$$

$$CH_3COCl;\ (CH_3CO)_2O + B_{12} \rightarrow B_{12}-Co-CO-CH_3$$

$$ClCOOC_2H_2 + B_{12} \rightarrow B_{12}-Co-COOC_2H_2$$

$$Br-C\equiv CH + B_{12} \rightarrow B_{12}-Co-C\equiv CH$$

$$CH_2=CH-Br + B_{12} \rightarrow B_{12}-Co-CH=CH_2$$

$$CH_2Cl\cdot CH_2OH + B_{12} \rightarrow B_{12}-Co-CH_2-CH_2-OH$$

$$\begin{matrix} CH_2-CH_2 \\ \diagdown\ \diagup \\ NH \end{matrix} + B_{12} \rightarrow B_{12}-Co-CH_2-NH_2$$

Enzimele cu coenzime cobamidice conțin Co(III), care prin reducere la Co(II) sau Co(I) prezintă o activitate biochimică intensă. Coenzimele sunt amestecuri de specii penta și hexacoordinate în echilibru, rapid interconvertibile.

Prin folosirea unor corinoide lipsite de Co, produse de *Chromatium D* (bacterie fotosintetică) și de unele streptomicete, s-a reușit introducerea pe cale chimică în molecula acestora a unor metale diferite (Cu, Zn, Ru), obținându-se noi omologi structurali ai vitaminei B_{12}, care au în loc de Co alte metale, de mare interes în cercetările biochimice și în chimia organometalelor (BEDELEANU, 1985).

10.3. OBȚINERE ȘI PROPRIETĂȚI

Vitamina B_{12} se poate extrage din diferite surse naturale (ficat, bacterii, ciuperci, din apele unor culturi ce produc antibiotice etc.). Dintr-o tonă de ficat se pot obține 250—300 mg vitamină B_{12}, prin proteoliza ficatului cu papaină, activată cu $K_4[Fe(CN)_6]$, absorbție pe coloane cromatografice din cărbune sau alumină și eluare cu etanol 65° la cald. Pentru purificare se recromatografiază extractul cu vitamina B_{12}, în soluție butanolică, pe coloane cu silice hidratată sau amidon, iar eluarea se face cu alcool 50°.

Scanned with OKEN Scanner

Vitamina B_{12} se poate extrage și din lichidele de cultură ale unor microorganisme utilizate pentru producerea antibioticelor (streptomicină, auromicină, tetramicină etc.) prin adsorbție pe coloane cromatografice cu bentonite, alumină, cărbune etc., eluare cu apă-acetonă și purificare. Un randament bun în obținerea vitaminei B_{12} dă *Bacillus megaterium*, cultivat pe melasă și săruri minerale. După 6 ore de la începerea culturii se obține un lichid bogat în vitamina B_{12}, care se poate extrage prin centrifugare și uscare.

Numeroase microorganisme ca *Streptomyces griseus, S. fradiae, S. olivaceus*, unele specii de *Propionbacterium*, unele microorganisme termofile (*Bacillus stearothermophilus, B. coagulans, B. cirgulans* etc.) sintetizează în cantități însemnate vitamina B_{12} în prezența fierului, zincului și a unor cantități mici de cobalt. Cuprul stimulează biosinteza cobamidelor, dar nichelul acționează ca inhibitor. Pentru obținerea vitaminei B_{12} în cantități mari pe cale industrială se folosesc speciile *Str. griseus* și *Str. olivaceus*. Unele bacterii (*Selenomonas ruminatium, Streptococcus elsdenii* etc.) care se găsesc în rumenul animalelor produc de asemenea cantități mari de vitamina B_{12} Unele specii din genurile *Mycoderma, Mucor* și *Rhizopus*, larg răspândite în sol, biosintetizează de asemenea vitamina B_{12}.

Pentru obținerea vitaminei B_{12} în cantități mari din produse naturale, frecvent se folosesc lichidele de cultură (mume) rămase după izolarea unor antibiotice (streptomicina, aureomicina, teramicina etc.), din apele de scurgere activate, din culturi ale unor microorganisme producătoare de vitamina B_{12} (*Bacterium megaterium, Streptomyces griseus, Bacillus stearothermophilus* etc.). Pentru a controla concentrația vitaminei B_{12} în mediul de extracție se folosește ca marker cultura speciei *Lactobacillus lactis* Dörner, pentru care această vitamină este o substanță de creștere. Extragerea vitaminei B_{12} din ficat s-a dovedit a nu fi o metodă economică. Dacă se introduce în hrana caprelor ^{60}Co se intensifică, biosinteza vitaminei B_{12} în tubul digestiv și apar mai mulți compuși radioactivi, cu structură similară cianocobamidei.

Din mediile de cultură ale unor microorganisme, alături de vitamina B_{12} s-au izolat și alte substanțe cu activitate vitaminică asemănătoare sau mai mică, precum și unii compuși cu Co, dar care nu au activitate vitaminică, pe care însă o capătă după o hidroliză enzimatică. Astfel, din culturile de *Streptomyces griseus* și din excrementele ierbivorelor, s-a izolat un produs cu cobalt inactiv fiziologic, care devine activ prin hidroliză pancreatică. Acest produs se comportă ca o provitamină B_{12}. Tot din culturile de *Streptomyces griseus* s-a obținut vitamina B_{12a}, obținută și prin hidrogenarea vitaminei B_{12}, care în testul de creștere a șobolanului are 50% din activitatea vitaminei B_{12}, iar în testul de creștere a puiului de găină de numai 30%. Prin barbotarea oxigenului în mediul de cultură, vitamina B_{12a} se transformă în vitamină B_{12}. Vitamina B_{12} s-a obținut din culturile de *Streptomyces aurofaciens*, care are o activitate biologică similară vitaminei B_{12}. Vitamina B_{12c} s-a izolat din culturile de *Streptomyces griseus*, prin metode cromatografice. Are spectru de absorbție diferit de al vitaminei B_{12} dar activitatea biologică este similară. Din același mediu de cultură s-a izolat și vitamina B_{12d}, care are spectru de absorbție și activitatea biologică similară vitaminei B_{12}.

Scanned with OKEN Scanner

Cobamidele sunt substanțe solide, cristaline, de culoare roșie, solubile în apă, etanol, metanol și insolubile în acetonă, cloroform, eter etilic etc. Sunt stabile la aer și în mediu acid (pH 4,5) și la cald. Nu rezistă la acțiunea oxidanților puternici, a acizilor și bazelor tari și a luminii. În soluție apoasă, vitamina B_{12} prezintă un spectru de absorbție caracteristic, cu maxime la 272, 361 și 550 nm. Este optic activă, levogiră (—59°) și rezistă la încălzire 20 de minute la 120°C.

Vitamina B_{12} se prezintă sub forma unor cristale aciculare, birefringerente, de culoare roșu-închis, care conțin 8 — 12% apă de cristalizare, fără punct de topire bine determinat. Bazele și acizii tari chiar la temperatura camerei, reduc foarte mult activitatea vitaminei B_{12}, fapt pentru care preparatele acide sau alcaline ale acestei vitamine nu pot fi sterilizate prin încălzire. Lumina, în special razele ultraviolete, descompun vitamina B_{12} aflată în soluție.

Vitamina B_{12} este incompatibilă cu substanțe cu reacție puternic acidă sau alcalină, cu agenți oxidanți sau reducători, cu sărurile unor metale grele etc. Este incompatibilă și cu tiamina, nicotinamida, care au un efect inhibant la concentrații mari, deoarece produșii lor de descompunere au proprietăți reducătoare. Inactivarea vitaminei B_{12} de către tiamină poate fi evitată dacă se adaugă în soluție săruri de fier. Acidul ascorbic, cisteina, sulfiți, glucoza etc., micșorează stabilitatea vitaminei B_{12} în soluții, iar florurile și ionii de mangan accelerează descompunerea vitaminei B_{12} în prezența vitaminei C. Nu este indicată administrarea vitaminei B_{12} concomitent cu $Ca_3(PO_4)_2$, talc sau manitol, deoarece aceste substanțe adsorb și scot din circulație vitamina B_{12} din organism.

Riboflavina favorizează fotoliza vitaminei B_{12}, efect potențat de nicotinamidă, dar diminuat prin adăugarea de antioxidanți.

Tabletele cu cianocobamidă pierd prin conservare 30 — 40% din activitate pe an. Soluțiile acestei vitamine pot fi protejate contra contaminării microbiene prin adaus de alcool benzilic 2% sau de azotat fenilmercuric 0,001%.

Vitamina B_{12} prin hidrogenare, în prezența paladiului, se transformă în vitamina B_{12} , care are o activitate biochimică de aproximativ 5 ori mai mică decât cianocobamida. În soluții acide și sub influența luminii, vitamina B_{12} se transformă în vitamina B_{12b}, reacția devine reversibilă dacă în mediu se adaugă cianidă.

10.4. METODE DE IDENTIFICARE ȘI DOZARE

Vitaminele B_{12} se pot identifica și doza prin metode fizice, chimice, biologice și microbiologice.

Dintre metodele fizice, o utilizare mai mare o au metodele spectrofotometrice și cele polarimetrice. Vitamina B_{12} prezintă în soluție maxime de absorbție la 278, 361 și 550 nm, iar pentru dozarea spectrofotometrică se folosește extincția specifică ($E^{1\%}_{m}$) la 361 nm care este de 270.

Metoda polarografică este folosită pentru dozarea cobaltului. Vitamina B_{12} conține 4% cobalt, ceea ce revine un atom de cobalt la o moleculă de vitamină.

Scanned with OKEN Scanner

Metodele cromatografice și cele electroforetice sunt utilizate pentru identificarea diferitelor cobamide și pentru separarea vitaminelor B_{12} de alți produși sau derivați ai săi.

Metodele chimice nu sunt prea specifice și se bazează pe determinarea 5,6-dimetil-benzimidazolului eliberat prin hidroliză acidă din vitamina B_{12}, precum și pe determinarea grupării —CN (cian), eliberată prin fotoliză în lumina monocromatică și determinată ca cianură.

Identificarea vitaminei B_{12} se poate face prin încălzirea a 0,5 mg de vitamină în prezența a 0,02 g de $KHSO_4$, iar după răcirea amestecului se adaugă o picătură de apă și trei picături de sulfocianat de potasiu în acetonă. În urma reacțiilor care au loc apare o coloratie albastră-verzuie.

Metodele biologice se bazează pe rolul vitaminei B_{12} în procesul de creștere a animalelor. Se efectuează testul de creștere pe șobolan și puii de găină sau iepure. Se folosește și testul de depozitare a vitaminei B_{12} în ficat, creșterea numărului de eritrocite în anemiile provocate cu fenilhidrazine, precum și pe culturi de țesuturi din măduva oaselor.

Pentru stabilirea anemiei pernicioase se determină acidul metilmalonic din urină, care la oamenii sănătoși are valori sub 2 mg/zi, dar care cresc foarte mult la bolnavii cu anemie pernicioasă, din cauza insuficienței cobaminenzimelor, care izomerizează metilmalonil-CoA la succinil-CoA. Tratamentele cu vitamină B_{12} au efect favorabil determinând o scădere a acidului metilmalonic, mai ales după ce se restabilește conținutul vitaminei B_{12} din sânge. Carența vitaminei B_{12} în sângele omului apare la un conținut sub 0,004 μg/100 ml. Starea carențială apare și prin creșterea vitaminuriei de 10 — 20 de ori mai mult față de valorile normale, prin eliminarea crescută a acidului metilmalonic și creșterea activității lacticodehidrogenazei serice de 10 — 100 ori față de valorile normale.

Metodele microbiologice se bazează pe stimularea creșterii unor microorganisme (*Lactobacillus lactis* Dörner, *L. leichmanii*, *Bacterium coli*, mutanți de *Escherichia coli* etc.), sub acțiunea vitaminei B_{12}.

Rezultatele acestor teste sunt modificate în prezența tiaminei și a unor dezoxiribonucleotide care asigură creșterea la *Lactobacillus lactis D.*, *L. leichmanii* și în absența vitaminei B_{12}.

Cantități mici de vitamina B_{12} (0,5 μg/ml) din diferite lichide biologice sau medii de cultură pot fi determinate cu ajutorul algei flagelate *Euglena gracilis*, care își pierde cilii în absența vitaminei B_{12}. Această algă nu interferează cu dezoxiribonucleotide dar necesită un timp mai îndelungat, de 4 — 5 zile. Pentru dozarea vitaminei B_{12} din urină se folosește protozoarul *Ochromonas malhomensis*. Unele flagelate (*Ochromonas malhomensis*, *Chlamydomonas pallens*, *Prymnesium parvum* etc.) au nevoie de cianocobamidă ca factor esențial de creștere.

10.5. RĂSPÂNDIRE ȘI NECESITĂȚI

Dintre sursele alimentare folosite de om mai bogate în vitamina B_{12} sunt ficatul (35 — 50 μg/100 g s.u.), rinichiul (15 — 20 μg/100 g), carnea (5 μg/100 g), ouăle (3 μg/100 g) și laptele (2 μg/100 g), restul alimentelor au un conținut foarte mic de vitamină.

Scanned with OKEN Scanner

Ficatul de vițel, ficatul peștilor și al crustaceelor conține aproximativ 2,4 ppm/g s.u. Un conținut relativ mai mare de vitamină B_{12} se găsește de asemenea în splină și în culturile unui mare număr de actinomicete și bacterii.

În plantele superioare conținutul vitaminei B_{12} este extrem de redus. Carența vitaminei B_{12} la oameni se datorește în majoritatea cazurilor unei slabe absorbții a acestei vitamine, deoarece omul și animalele își procură vitamina B_{12} prin hrană, iar în cantități însemnate prin intermediul florei intestinale. La oameni simptomele avitaminozei B_{12} s-au remarcat în special la vegetarieni. Bolnavii de anemie pernicioasă, pentru însănătoșirea lor, au nevoie de 40 mg vitamină B_{12} la fiecare șase săptămâni minim.

Datorită biosintezei vitaminei B_{12} de către unele microorganisme intestinale și din prestomacele ierbivorelor, conținutul vitaminei B_{12} în rumenul animalelor și în intestinul gros are valori mari de 50 μg/100 g conținut uscat. Unele țesuturi și tumori la șoareci și iepuri produc cantități mici de vitamină B_{12}.

Necesarul minim zilnic pentru adulți și copii mici este de 3 μg de vitamină B_{12}, iar la copii mai mari este de 1 μg. Necesarul de vitamină B_{12} crește la femei în perioadele de sarcină (3,2 μg/zi) și la alăptare (3,6 μg/zi), în unele stări de convalescență la 4 μg/zi. Unele instituții de cercetare recomandă un consum zilnic de 0,15 μg/100 Kcal de energie pentru copiii mici și pentru cei preadolescenți. Vitamina B_{12} reprezintă una din cele mai active substanțe cunoscute. Experimental s-a dovedit că administrarea de numai 1 μg/zi de vitamină B_{12} unui bolnav de anemie pernicioasă produce activarea intensă a hematopoiezei.

Conținutul vitaminei B_{12} din hrană și cantitatea produsă de flora intestinală asigură necesarul omului și al animalelor în această vitamină. Conținutul total al vitaminelor B_{12} se apreciază la oamenii adulți între 1 și 11 mg, cu o valoare medie de 3 — 5 mg. Vitamina B_{12} este depozitată predominant în ficat, cu un conținut total de 1 — 10 mg iar o valoare medie de 1,5 — 2 mg). În rinichi, inimă, splină și creier conținutul total al vitaminelor B_{12} este cuprins între 20 — 30 μg pentru fiecare organ. La unii oameni cantitatea de vitamină B_{12} depozitată în ficat este suficientă pentru funcționarea organismului până la 6 ani (DELVIN, 1986).

10.6. ABSORBȚIE, TRANSPORT ȘI EXCREȚIE

Absorbția vitaminei B_{12} din alimente și cea produsă de flora intestinală are loc la nivelul intestinului subțire și necesită prezența unui factor intrinsec (FI), care este o glicoproteină secretată de mucoasa gastrică. Vitamina B_{12} obținută în stare liberă din alimente, uneori în urma unui proces de hidroliză, se leagă în cavitatea gastrică și în lumenul intestinal de factorul intrinsec, rezultând un complex vitaminoglicoproteic, care se absoarbe prin intestinul subțire în decurs de 2 — 3 ore. Vitamina B_{12} cuplată cu factorul intrinsec pierde proprietatea de a difuza prin membrana intestinală. Cuplarea vitaminei B_{12} cu factorul intrinsec reprezintă prima etapă în absorbția vitaminei. Factorul intrinsec are un rol de protecție asupra vitaminei B_{12}. Complexul vitaminoproteic numit

Scanned with OKEN Scanner

și eriteina 3, nu este utilizat de bacterii ca factor de creștere, iar pe de altă parte factorul intrinsec înlătură din sistem (lumenul intestinal) inhibitorii vitaminei B_{12}. Conținutul factorului intrinsec este extrem de redus la bolnavii cu anemii pernicioase, fapt ce are ca efect o absorbție scăzută și defectuoasă a vitaminei B_{12}. Formarea complexului vitamină B_{12} — factor intrinsec are loc în prima etapă în stomac sub acțiunea sucului gastric și a acidului clorhidric. Acest proces se continuă și în lumenul intestinului subțire sub acțiunea sucului duodenal.

În lipsa sucului gastric și a sucului duodenal, vitamina B_{12} nu este activă. Sucul gastric provenit de la bolnavii cu anemie pernicioasă conține numai 1/10 — 1/20 din cantitatea normală de factor intrinsec fapt pentru care se formează o cantitate redusă de complex vitaminoproteic, care trece bariera intestinală. La oamenii sănătoși factorul intrinsec fixează până la 264 μg vitamină B_{12}/mg.

O cantitate foarte mică de vitamina B_{12} în stare liberă trece prin membrana intestinală, prin difuzie, fără să fie cuplată cu factorul intrinsec. Această cale secundară se produce numai când s-au administrat oral doze mari de vitamina B_{12}, iar cantitatea absorbită nu depășește 1% din doza administrată.

Factorul intrinsec izolat de la unele specii de animale, nu poate stimula absorbția vitaminei B_{12} la alte animale sau la om, provocând uneori o blocare a mecanismului de absorbție. Acest factor este termolabil, rezistă 30 de minute la 70 — 80°C, iar „in vitro" este inactivat de pepsină sau tripsină.

Anemia pernicioasă apare la om ca o consecință a unei dereglări a absorbției vitaminei B_{12} sau a denaturării factorului intrinsec, fie datorită unei aclorhidrii accentuate, fie operației la stomac în regiunile „cardia" și „fundus" care produc acest factor. Absorbția vitaminei B_{12} este diminuată după gastrectomie de prezența anticorpilor autoimuni, infecțiilor intestinale și paraziților (*Diphyllothrium latum* etc.). Factorul intrinsec stimulează absorbția vitaminei B_{12} când aceasta se află în cantitate mică în hrană. Prin administrarea orală a unor doze mari de vitamina B_{12}, în jur de 300 mg, sau prin injectarea acesteia intramuscular (10 — 25 mg), se produce o creștere a conținutului vitaminei B_{12} din sânge și în absența factorului intrinsec. În ce privește mecanismul de acțiune a factorului intrinsec, G.A. Goldsmith consideră că acesta mediază combinarea vitaminei B_{12} cu „proteine receptoare" din ser, care pot fi localizate intracelular în fracțiunile solubile și în microzomi. Materialul receptor este format dintr-o proteină și acid ribonucleic. Același autor consideră că factorul intrinsec este un hormon cu rol important în reglarea metabolismului vitaminei B_{12}. Mecanismul intim de acțiune a factorului intrinsec încă nu se cunoaște în totalitate. Conținutul mediu total al vitaminei B_{12} la oamenii adulți variază între 3 și 5 mg.

Absorbția vitaminei B_{12} este diminuată și de alcool, acid p-aminosalicilic, colesterilamină, colchicină, neomicină, precum și de stări de hipovitaminoză B_6. Unele amide substituite, lactone și analogi lactomici ai cianocobamidei manifestă competitivitate în legarea factorului intrinsec, fapt ce diminuează absorbția vitaminei B_{12}.

După absorbție, complexul vitamină — factor intrinsec se desface, iar o parte din vitamina B_{12} va fi preluată de proteinele plasmatice transportoare (α_1, α_2, β-globuline) care o vor preda apoi unor celule speciale

Scanned with OKEN Scanner

cu proteine receptoare (transcobamide). Conținutul vitaminei B_{12} din plasmă variază între 200 — 900 pg/ml (în medie 450 pg/ml), maximul concentrației fiind obținut după 8 — 12 ore de la ingestie. Capacitatea de legare a plasmei este de 1 850 pg/ml de vitamină B_{12}.

Vitamina B_{12} care nu este cuprinsă în circuitul sanguin se va depozita predominant în ficat (50 — 90%) și în alte organe (rinichi, inimă, splină, aproximativ 20 —30 µg pentru fiecare organ). În oase, conținutul vitaminei B_{12} este foarte redus, iar eritrocitele practic nu conțin această vitamină.

În ficat vitamina B_{12} este convertită în forme coenzimatice (cobamid coenzime) prin înlocuirea grupării cian (CN) de o adenin-nucleozidă (în special de 5'-dezoxiadenozin-cobamida) sau de gruparea metil. La mamifere, 5-dezoxiadenozin-cobamida este o coenzimă a metilmalonil-CoA-izomerazei, care joacă un rol important în transformarea acidului propionic în acid succinic. În avitaminoza B_{12} se produce excreția acidului metilmalonic prin urină, care se intensifică prin administrarea de acid propionic.

O parte din vitamina B_{12} legată de transcobamide ajunge la ficat și la alte țesuturi și organe, unde se depozitează. La nivelul țesuturilor, complexul de vitamină B_{12} cu transcobamidă se desface, iar vitamina este eliberată în citosol sub formă de hidroxicobamidă. În citosol hidroxicobamida este convertită în metilcobamidă, care intrând în mitocondrie, formează prin reducere 5'-dezoxiadenozin-cobamidă. La omul sănătos, în ficat se găsesc în mod frecvent trei compuși cobamidici (metil-, hidroxi- și adenozincobamidă). Acești compuși iau parte, cu rol de coenzime în numeroase procese metabolice din organism.

Timpul de înjumătățire a vitaminei B_{12} din plasma sângelui este de 5,14 zile, iar în ficat este de aproximativ un an. În serul sanguin numai 1 — 10% din cantitatea vitaminei B_{12} se găsește în stare liberă sau foarte slab legată de proteine.

Vitamina B_{12} se găsește în sânge sub diferite forme (hidroxicobamidă, 5'-adenozincobamidă, metilcobamidă etc.) cu variații circadiene de 80îpg. față de conținutul total (200 — 900 pg/ml). Cantitatea vitaminei B_{12} din sânge reprezintă aproximativ 0,1% din conținutul total al acesteia din organism, iar în eritrocite cantitatea vitaminei B_{12} este infimă, practic neglijabilă, cu toate că vitamina B_{12} se poate lega de hemoglobină și de stroma eritrocitelor. Cantitatea de vitamină B_{12} din ser crește de două ori în leucemii și scade de 10 — 20 de ori în anemia pernicioasă.

Vitamina B_{12} din sânge este transportată la diferite organe de cel puțin două proteine; de *transcobamida I* (care conține o α_1-globulină), cu un conținut de 8 µg/100 ml și de *transcobamida II* (care conține o β-globulină), cu un conținut de 20 µg/100 ml. Transcobamida I are masa moleculară de 120.000 UMA, migrează electroforetic cu α-globulinele și leagă puternic cobamida. Ea transportă aproximativ 70 — 80% din cantitatea vitaminei B_{12}. Are timpul de înjumătățire de 9 zile, fapt pentru care unii cercetători o consideră ca o formă „de depozitare" în circulație.

Transcobamida II este o proteidă dimer, formată dintr-o subunitate cu masa moleculară de 38 000, iar a doua de 25 000, cu migrare similară β-globulinei, legată însă mai slab de vitamina B_{12}. Are timpul de înjumătățire de 12 ore. Ea face parte dintr-un complex implicat în transportul plasmatic, ușurând pătrunderea vitaminei B_{12} în reticulocite,

Scanned with OKEN Scanner

unde se leagă de o glicoproteidă, precum și în tumorile ascitei Ehrlich. La un conținut mai redus de transcobamidă II se remarcă o scădere a imunoglobulinelor (Ig). Aproximativ 10% din vitamina B_{12} legată de transcobamida II este ușor eliberată prin urină. Hidroxicobamida și 5'-adenozincobamida se leagă mai puternic decât cianocobamida de proteinele plasmatice și tisulare, având o persistență mai lungă în organism.

Vitamina B_{12} din sânge se poate combina stoichiometric cu transcobamide, cu α-globuline (α_1- sau α_2-globuline), β-globuline, iar „in vitro" s-a legat și de γ-globuline.

Spre deosebire de vitamina B_{12} liberă, cea combinată cu globulinele serice nu trece bariera renală. β-globulinele au un rol mai activ în transportul vitaminei B_{12}, iar α-globulinele în depozitarea acestei vitamine în ficat și în alte organe.

Excreția vitaminei B_{12} se face în cea mai mare parte prin urină, fecale, bilă, splină etc., în cantitate totală de 2 — 5 μg/zi la oamenii adulți. O parte din vitamina B_{12} excretată prin bilă este resorbită în partea distală a intestinului.

Excreția vitaminei B_{12} prin urină este relativ mică la oamenii sănătoși, variind între 0,10 și 0,025 μg/zi, fiind eficient conservată în organism. Din cantitatea de vitamină B_{12}, 0,5 — 5 μg/zi eliminată prin tubul digestiv, aproximativ 65 — 75% se resoarbe în ileum. Dacă se administrează parental doze de peste 1 μg de vitamină B_{12}/zi, crește în mod simțitor cantitatea de vitamină eliminată prin urină. Cantitatea de vitamină B_{12} eliminată prin urină devine mai mare atunci când doza de vitamina B_{12} dată parental depășește capacitatea de legare a acesteia în ficat, sânge, în alte țesuturi și organe. Astfel dacă se administrează parental o doză de 50 μg de vitamină B_{12} aproximativ 90 — 95% din doza administrată este reținută în corp. Dacă doza administrată variază între 100 și 1000 μg, cantitatea de vitamină eliminată prin urină în 24 de ore reprezintă 50 — 95% din doza administrată. DAN BEDELEANU (1985) menționează că după injectarea la șobolan a 4,24 μg de ^{60}Co—B_{12}, s-a înregistrat după 24 de ore următoarea distribuție a radioactivității: prin urină 50%, prin fecale 6%, iar restul s-a localizat în ficat, rinichi, splină, inimă, creier. Dacă administrarea s-a făcut „per os", repartizarea radioactivității în fecale a fost de 81%, iar în urină numai de 1%, restul apărând în diferite organe, fapt ce sugerează o eliminare diferită, în funcție de calea de administrare. La om, din 100 μg de vitamină B_{12} administrată parental, 50 — 75% se elimină netransformată. Prin urină se elimină numai formele libere ale vitaminei B_{12} întrucât formele legate de proteine nu pot trece (filtrate) prin globerulii renali. Se înregistrează un „prag de eliminare renală". La concentrații sub 1 μg/100 ml ser nu se realizează excreția urinară. O parte din vitamina B_{12} neabsorbită și cea eliminată prin secreția gastrică și pancreatică, se elimină prin fecale, aproximativ 3 — 6 μg/zi. La oamenii sănătoși se constată o corelație strânsă între conținutul vitaminei B_{12} din corp și cantitatea de vitamină eliminată prin urină și fecale.

Unitatea de vitamină B_{12} este doza minimă necesară pentru a proteja un adult de anemia macrocitară. În greutate, reprezintă 1 ppm/zi de produs (vitamina B_{12}) cristalin, fiind egal cu activitatea unei unități de extract de ficat.

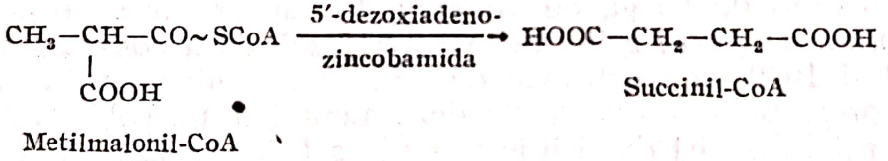
Scanned with OKEN Scanner

10.7. ROL ȘI ACȚIUNE BIOCHIMICĂ

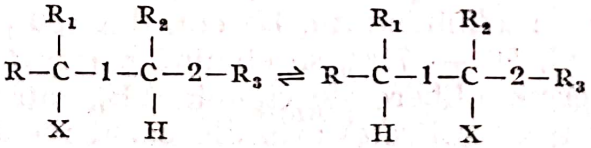
Vitamina B_{12} împreună cu formele sale coenzimatice (5'-dezoxiadenozincobamida, metilcobamida etc.) au un rol esențial pentru om și animale în procesele de creștere, hematopoieză, menținerea integrității celulei nervoase, precum și în reacțiile metabolice ale proteinelor, lipidelor și glucidelor.

Vitamina B_{12} este un factor de creștere indispensabil pentru unele microorganisme (*Lactobacillus lactis* Dörner, *L. leichmanii*). alge (*Euglena gracilis*), pentru copii și organismele animale tinere. Ea îndeplinește și rolul de factor cu acțiune antipernicioasă.

În numeroase procese metabolice fundamentale, un rol important îl au reacțiile enzimatice care conțin coenzime cobamidice cum sunt 5'-dezoxiadenoxincobamida, metilcobamida, hidroxicobamida etc. Coenzimele cobamidice nu conțin gruparea cian în molecula lor. Enzimele care conțin ca și coenzimă 5'-dezoxiadenozincobamida sunt mutaze, izomeraze, transferaze care catalizează reacții prin transfer de hidrogen, NH_3, $—CH_3$ etc. și de formare a unei noi legături C—C. Din această grupă de enzime face parte metilmalonil-CoA-mutaza, extrasă din ficatul de bou și șobolan, care determină transformarea metilmalonil-CoA rezultată prin carboxilarea propionil-CoA cu CO_2 la succinil-CoA, ce se va metaboliza ulterior prin ciclul lui Krebs.



În lipsa vitaminei B_{12}, acidul metilamonic apare în urină în cantitate însemnată. Mecanismul general de acțiune al izomerazelor, transferazelor și mutazelor care conțin coenzime cobamidice se prezintă astfel:

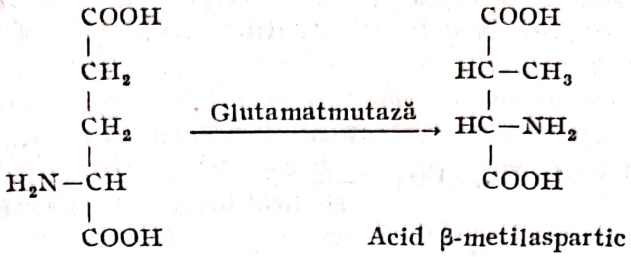


Trăsătura comună a reacțiilor catalizate de 5'-dezoxiadenozincobamida este transferul 1, 2 al unui atom de hidrogen de la un atom de carbon la cel următor. Acest transfer este de obicei însoțit de transferul invers, 2, 1 a unei alte grupări (hidroxil, amino, carboxil, aril, alchil etc.). Mecanismul acestor reacții este mult mai complicat și încă nu a fost definit complet.

O altă enzimă care conține 5'-dezoxiadenozincobamida este glutamatmutaza, care determină transformarea acidului glutanic în acid

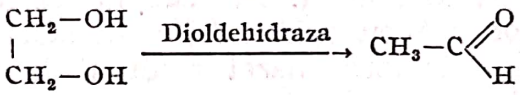
Scanned with OKEN Scanner

β-metilaspartic. Această reacție s-a pus în evidență prima dată la bacteria *Clostridium tetanomorfum:*



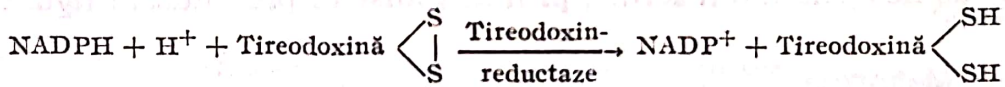
Acid glutamic — Acid β-metilaspartic

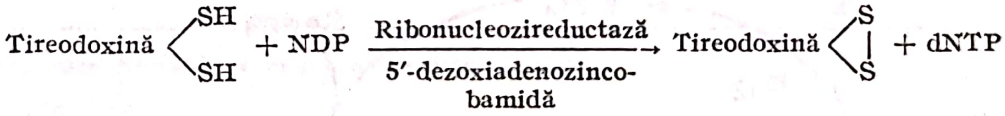
În unele microorganisme, dioldehidraza, care conține ca și coenzimă 5'-dezoxiadenozincobamida, determină conversia etilenglicolului în aldehida acetică.



Etilenglicol — Aldehida acetică

O enzimă cobamidică deosebit de importantă este ribonucleotidreductaza, care catalizează transformarea prin reducere a ribonucleozidtrifosfaților la 2'-dezoxiribonucleozidtrifosfați, care contribuie la biosinteza ADN. În acest proces sunt implicate tireodoxina, proteină ce conține o grupare disulfurică și tioredoxinreductaza, o enzimă ce catalizează în prezența NADPH reducerea legăturii disulfurice din molecula tireodoxinei.

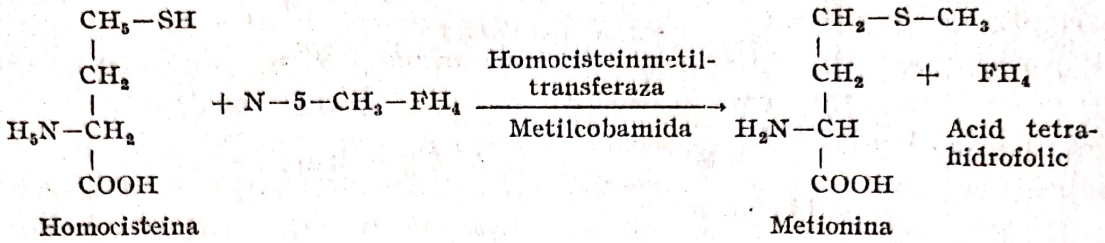




Ribonucleotidreductaza are rol important în convertirea ribonucleotidelor în dezoxiribonucleotide, având un rol însemnat în biosinteza acizilor nucleici și a proteinelor. La șobolan, în stare de hipovitaminoză B, scade conținutul total al acizilor nucleici, precum și raportul ADN/ARN din ficat. Prin administrarea de cianocobamidă și acid folic se normalizează raportul ADN/ARN, precum și raportul timină/uracil. Acest proces se realizează atât în ficatul animalelor carențate, cât și în măduva bolnavilor de anemie pernicioasă. Dacă conținutul aminoacizilor liberi din corpul omului este în exces, vitamina B_{12} determină o creștere a nivelului acidului uric, fie prin stimularea biosintezei purinelor generatoare de acid uric, fie catabolizării excesului de aminoacizi. Se produce totodată o creștere a azotului neproteic (uremie) și a aminoaciduriei la bolnavii cu anemie pernicioasă.

A doua grupă de enzime cobamidice, care conțin ca și coenzimă metilcobamida, au un rol important în reacțiile de biosinteză și de interconversiune a aminoacizilor, precum și utilizarea acestora în biosinteza proteinelor. Vitamina B_{12} are un rol important în interconver-

siunea și biosinteza glicocolului, leucinei, tirozinei, acidului aspartic etc. Din această grupă face parte și homcisteinmetiltransferaza, care determină metilarea homocisteinei cu formarea de metionină. Donorul grupării metil este acidul N-5-metiltetrahidrofolic (N-5-CH_3-FH_4).



În această reacție metilcobamida funcționează ca transportor al grupei metil de la acidul N-5-CH_3-FH_4 la homocisteină, care prin metilare se transformă în metionină. În reacțiile de metilare, coenzimele cobamidice interacționează cu acidul folic. În stări carențiale ale vitaminei B_{12}, activitatea dehidrogenazei acidului hidroximetil-tetrahidrofolic este substanțial redusă. Se presupune că vitamina B_{12} este un cofactor în acest sistem enzimatic.

În stări de hipovitaminoză, datorită dereglării absorbției vitaminei B_{12}, homocisteina rămâne nemetilată și se elimină prin urină (homocisteinurie), iar dacă se produce o dereglare la nivelul transcobamidelor se elimină prin urină acidul metilmalonic (acidurie metilmalonică).

Transformarea homocisteinei în metilonină are loc în citoplasmă, sub acțiunea homocisteinmetiltransferazei, care are ca și coenzimă metilcobamida. Gruparea CH_3 din metionină se poate obține și printr-un proces de neogeneză din serină, prin mecanismul prezentat în figura 10.5.

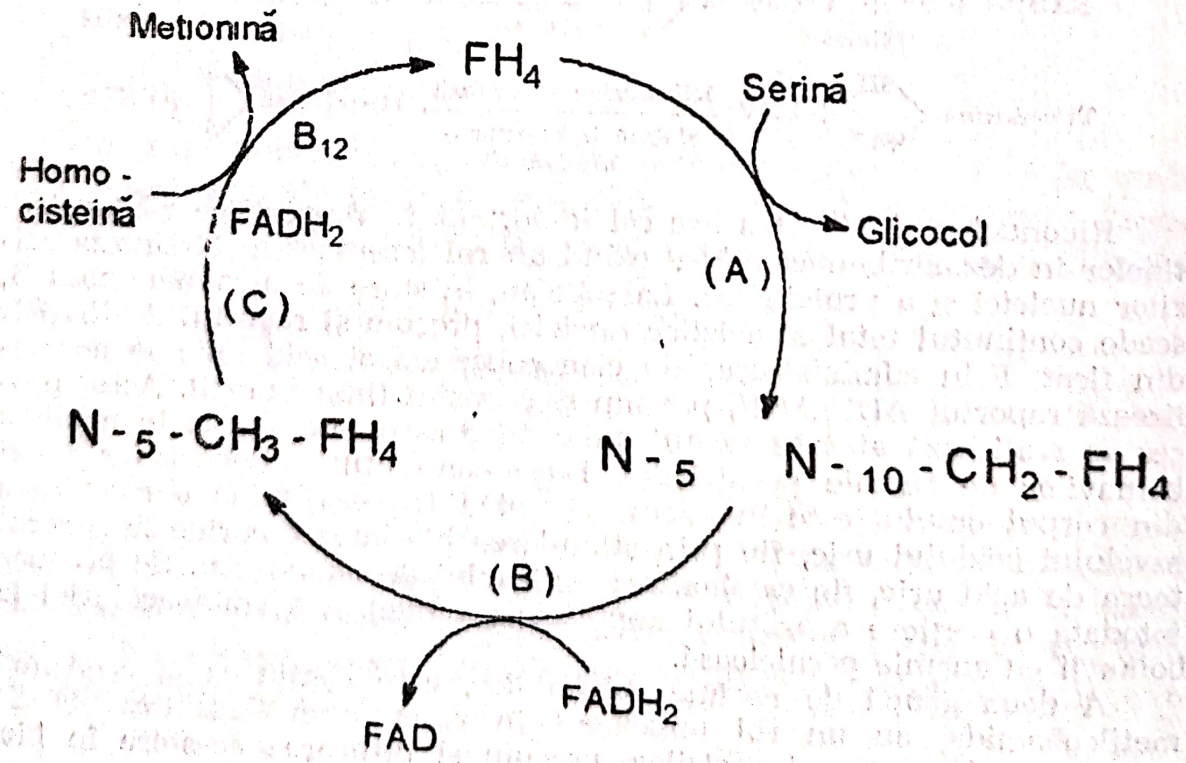


Fig. 10.5. Metilarea homocisteinei cu ajutorul serinei

În carență de vitamina B_{12} se produce o scădere accentuată a derivaților formilați ai acidului folic și folinic, fapt ce determină scăderea biosintezei nucleotidelor purinice și implicit și biosinteza acizilor nucleici.

Vitamina B_{12} are un rol important în biosinteza porfirinelor inclusiv a hemoglobinei. În anemia pernicioasă, datorită conținutului redus al vitaminei B_{12} și a acizilor folici, biosinteza porfirinei este substanțial diminuată și crește conținutul fierului seric liber, datorită scăderii capacității de biosinteză a hemoglobinei.

Vitamina B_{12} stimulează biosinteza fosfolipidelor la om și animale. Bolnavii de anemie pernicioasă au un conținut scăzut de fosfolipide în diferite țesuturi, inclusiv în oase. Administrarea de vitamină B_{12} la organismele carențate în cianocobamidă determină o creștere a biosintezei lipidelor simple și complexe, chiar în cazul unui regim alimentar vegetarian.

Vitamina B_{12} are un rol însemnat și în metabolismul glucidelor, favorizând gluconeogeneza. În stări carențiale scade biosinteza glucidelor din aminoacizii glucoformatori (alanină, serină, cisteină etc.). Vitamina B_{12} stimulează metabolizarea fructozei, a glicogenului și a glicerolului. Administrarea glucozei și a lactozei în cantități mai mari necesită un conținut sporit de cianocobamidă. În metabolismul glucidic se pare că glutationul, care este coenzima gliceroaldehid-3-fosfodehidrogenazei are un rol însemnat, conținutul acestei enzime fiind mult redus în stări de hipovitaminoză B_{12}.

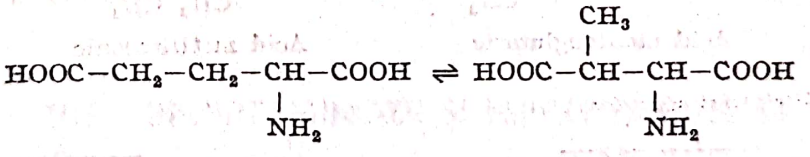
Unele reacții metabolice, catalizate de enzime ce conțin coenzime cobamidice, sunt trecute în tabelul 10.1.

Tabelul 10.1

Reacții enzimatice cu coenzime cobamidice
(după F. KORTE, M. GOTO, 1977)

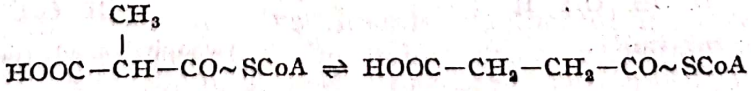
A. Reacții care necesită coenzime adenozincobamidice

1. *Glutamatmutaza*



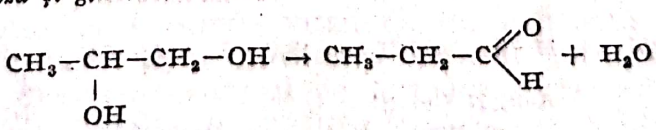
Acid L-glutamic — Acid L-threo-β-metilaspart

2. *Metilmalonil-CoA-mutaza*



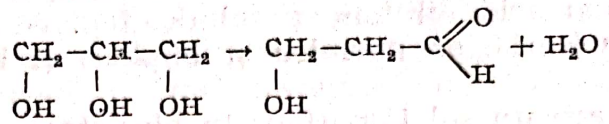
Metilmalonil-CoA — Succinil-CoA

3. *Propandioldehidraza și gliceroaldehidraza*



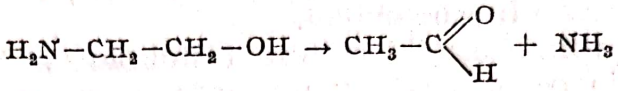
1,2 Propandiol — Propanaldehidă

Scanned with OKEN Scanner



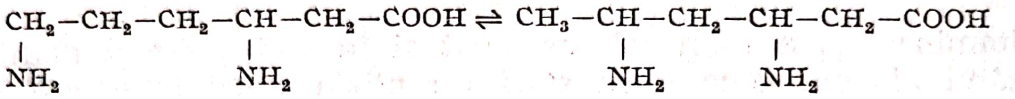
Glicerol — β-Hidroxipropionaldehidă

4. *Etanolamindezaminaza*

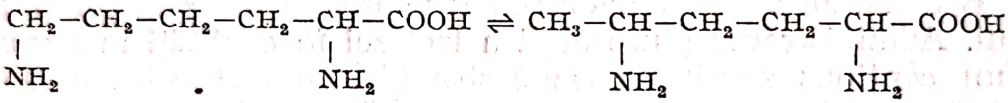


Etanolamina — Acetaldehida

5. *L-β-lizinmutaza și D-α-lizinmutaza*

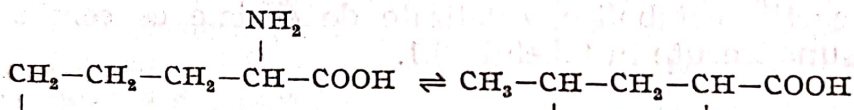


L-β-lizină — Acid L-eritro-3,5-diaminohexanoic



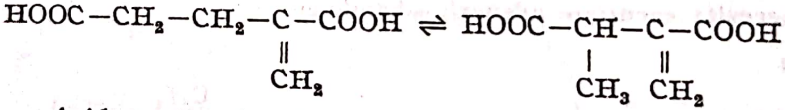
D-α-lizină — Acid 2,5-diaminohexanoic

6. *Ornitinmutaza*



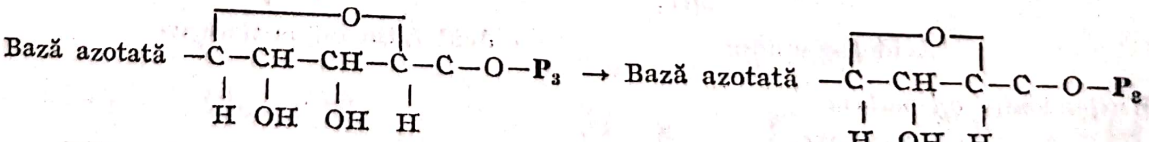
D-Ornitina — Acid 2,5-diaminopentanoic

7. *α-Metilenglutaratmutaza*



Acid metilenglutaric — Acid metilitaconic

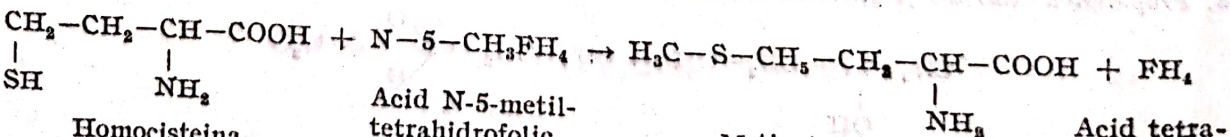
8. *Ribonucleozidtrifosfatreductaza*



Ribonucleozidtrifosfat — Dezoxiribonucleozidtrifosfat

B. Reacții care necesită metilcobamide

1. *Sinteza metioninei*



Homocisteina — Acid N-5-metil-tetrahidrofolic — Metionina — Acid tetrahidrofolic

Scanned with OKEN Scanner

Tabelul 10.1 (continuare)

2. *Sinteza metanului*

$$\underset{\text{Acid N-5-metil-tetrahidrofolic}}{N-5-CH_3-FH_4} \rightarrow \underset{\text{Acid tetrahidrofolic}}{FH_4} + \underset{\text{Metan}}{CH_4}$$

3. *Sinteza acetatului*

$$\underset{\text{Acid N-5-tetrahidrofolic}}{N-5-CH_3-FH_3} + CO_2 \rightarrow \underset{\text{Acid acetic}}{CH_3-COOH} + \underset{\text{Acid tetrahidrofolic}}{FH_4}$$

Din reacţiile prezentate în tabelul 10.1, reiese că vitamina B_{12} şi coenzimele sale au un rol însemnat în scindarea şi formarea legăturilor C-C, eliminarea apei şi a amoniacului, în transferul grupărilor $-CH_3$, $-NH_2$, în biosinteza metanului etc.

Vitamina B_{12} influenţează în general metabolismul azotat, în special interconversiunea şi biosinteza aminoacizilor, biosinteza acizilor nucleici şi a substanţelor proteice, biosinteza bazelor azotate, a nucleului porfirinic, biosinteza creatinei din metionină, a serinei din glicocol, a metioninei din homocisteină etc.

Împreună cu acidul pteroilglutamic, vitamina B_{12} intervine în procesele de transmetilare. Toate aceste procese sunt dereglate în stări de hipovitaminoză B_{12}. Vitamina B_{12} este implicată în menţinerea grupărilor tiolice (-SH) sub formă redusă. în metabolismul fragmentelor şi compuşilor cu un singur carbon, activează în mod specific biosinteza grupărilor metil etc.

Vitamina B_{12} îndeplineşte rolul unui compus intermediar în formarea globulelor sanguine, a tecii nervilor şi a numeroase proteine. Această vitamină este esenţială pentru formarea şi dezvoltarea eritrocitelor, maturarea celulelor epiteliale, în special cele din tubul digestiv, precum şi în biosinteza acizilor folici şi în regenerarea acidului folic în timpul formării eritrocitelor.

10.8. HIPOVITAMINOZE ŞI HIPERVITAMINOZE

În stări de avitaminoză sau hipovitaminoză B_{12}, care apar ca urmare a dereglării absorbţiei acestei vitamine la nivelul intestinului subţire, fie datorită lipsei sau insuficienţei factorului intrinsec secretat în stomac de mucoasa gastrică, fie aclorhidriei, rezecţiei stomacale sau apariţiei unor afecţiuni intestinale, prezenţa unor inhibitori ai absorbţiei şi în foarte rare cazuri lipsei vitaminei B_{12} din hrană, apare anemia pernicioasă, numită şi boala lui Biermer, ce se datoreşte incapacităţii organismului de a asimila vitamina B_{12} existentă în produsele vegetale şi animale şi în flora intestinală. Anemia pernicioasă este o boală sanguină care afectează procesul de formare a eritrocitelor şi a leucocitelor. Numeroase celule din măduva spinării nu se divid, rămân mari, numărul eritrocitelor este redus şi apar granulocite gigantice, apare o

Scanned with OKEN Scanner

eritropoieză anormală de tip megaloblastic, însoțită de o dereglare a leucopoiezei și a formării de trombocite.

Această boală macrocitară, hipercromă se caracterizează nu numai prin dereglări ale eritropoiezei ci și prin tulburări nervoase, prin apariția de nevrite periferice și chiar leziuni degenerative. Se produce o scădere a răspunsurilor reflexe și a percepției senzoriale, greutate în vorbire și la mers, apar tulburări gastrice (aclorhidrie) și intestinale, cu atrofierea mucoaselor digestive, cu limbă dipapilată dureroasă, astenie, paloare, dispnee, diminuarea mirosului, gustului, scăderea în greutate, paralizii, iritabilitate, slăbirea memoriei, stări depresive cu halucinații, disfuncțiuni cardiace etc. Este dereglată biosinteza acizilor nucleici și a proteinelor etc.

Simptomul cel mai caracteristic al apariției anemiei pernicioase constă în pierderea capacității de diviziune normală a celulelor, mai ales a celor cu ritm rapid de refacere, cum sunt celulele din măduva spinării (hematoformatoare) și cele din mucoasa intestinală. Celulele nedivizate au aspect megaloblastic — macrocitar caracteristic, apar granulocite gigante (macrocite), care deși păstrează capacitatea de transport a oxigenului nu pot îndeplini în mod satisfăcător această funcție, atât datorită numărului mic de eritrocite, insuficient dezvoltate, cât și datorită scurtării timpului de viață a acestora cu 30—50% față de hematiile normale, fenomen atribuit fragilității membranei externe. Se intensifică totodată activitatea trombocitelor. Se produce de asemenea atrofierea mucoaselor digestive, ale aparatului excretor și de reproducere, cu apariția de celule epiteliale voluminoase. Anemia pernicioasă propriu-zisă se datorește incapacității măduvei spinării de a biosintetiza eritrocite normale. Din cauza diviziunii defectuoase a celulelor din măduva spinării eritrocitele care se formează sunt mici, imature și au o viață scurtă de existență, neputând să-și îndeplinească satisfăcător funcțiile biochimice.

În conformitate cu teoria lui Castle pentru biosinteza de eritrocite normale, omul și organismele animale au nevoie de un factor antipernicos numit și factor antianemic activ, care ia naștere din interacțiunea factorului intrinsec, secretat de mucoasa gastrică și a factorului extrinsec, de proveniență animală, care este însăși vitamina B_{12} din alimente. Anemia pernicioasă poate să apară datorită lipsei unuia din cei doi factori, intrinsec sau extrinsec, din interacțiunea cărora apare factorul antipernicios.

Factorul intrinsec este o glicoproteidă cu specificitate absolută, produsă de unele regiuni ale mucoasei gastrice și aflată în mod obișnuit în constituția sucului gastric, unde se unește cu vitamina B_{12} provenită din alimente și formează un complex „vitaminoglicoproteic". Acest complex va fi transportat ulterior chiar de sucul gastric în intestinul subțire, unde sub acțiunea altor cofactori se va produce absorbția complexului vitaminoproteic prin membrana intestinului subțire. La bolnavii de anemie pernicioasă nu se biosintetizează factorul intrinsec în mucoasa gastrică, sau dacă se formează în cantități mici este dereglată activitatea sa, astfel încât nu se poate forma factorul antipernicios. Existența unei aclorhidrii, rezistentă la acțiunea bazică a histidinei, pune în evidență rolul însemnat al mucoasei gastrice și apariția anemiei pernicioase. Lipsa factorului intrinsec împiedică absorbția vitaminei B_{12}, astfel încât această afecțiune nu se datorește insuficienței

Scanned with OKEN Scanner

vitaminei B_{12} în alimente, ci datorită incapacității absorbției acesteia în lipsa factorului intrinsec.

Pe cale experimentală s-a dovedit că anemia pernicioasă se poate vindeca prin administrarea „per os" de vitamină B_{12} asociată cu suc gastric normal. Dacă sucul gastric provine de la oameni cu anemie pernicioasă, rezultatele nu mai sunt pozitive, datorită lipsei factorului intrinsec în sucul gastric al oamenilor bolnavi. În tratamentul anemiei pernicioase trebuiesc administrați concomitent cei doi factori intrinseci, precum și acid folic, deoarece există un sinergism funcțional între acidul folic și vitamina B_{12}. Acidul folic stimulează procesul de eritropoieză, iar vitamina B_{12} stimulează atât activitatea globulelor roșii cât și a sistemului nervos.

Apariția deplină a anemiei pernicioase necesită un timp mai îndelungat, întrucât vitamina B_{12} din depozitele tisulare se consumă în mod treptat și are un timp de viață îndelungat. În ficat se găsesc 1,5—2 mg de vitamină B_{12}, iar „jumătatea din viața biologică" a acesteia este de 400 de zile. Anemia pernicioasă nu ar apărea la oamenii bolnavi dacă aceștia ar putea absorbi zilnic prin intestin 1 μg de vitamina B_{12}.

Acest fenomen practic nu se produce din lipsa factorului intrinsec. Pe lângă factorul intrinsec, importantă în procesul de absorbție a vitaminei B_{12} este și „enzima de eliberare" (EE) din intestin. Bolnavii de anemie pernicioasă elimină cantități mai mari de vitamina B_{12} prin fecale, fapt ce indică dereglări în procesul de absorbție a vitaminei.

La copii sub 2—3 ani apare anemia pernicioasă congenitală, prin deficit de vitamină B_{12} datorită lipsei factorului intrinsec, neînsoțit de alterări ale mucoasei gastrice sau de aclorhidrie. La adolescenți apare anemia pernicioasă juvenilă, care se datorește lipsei de secreție a factorului intrinsec, fiind asociată cu gastrită atrofică și aclorhidrie. Serul acestor copii conține anticorpi care anihilează activitatea factorului intrinsec. Anticorpii antiintrinseci sunt transportați de γ-globuline și inhibă absorbția vitaminei B_{12}.

Cazuri clinice de anemie pernicioasă la oameni datorită carenței vitaminei B_{12} din alimente sunt extrem de rare, acestea fiind semnalate la vegetarieni și la oamenii ce consumă cantități mari de antagoniști ai vitaminei B_{12} (alcool, contraceptive orale etc.).

Simptomele deficienței vitaminei B_{12} sunt similare cu cele care apar în carența acidului folic, astfel încât uneori sunt greu de diferențiat. Scade biosinteza proteinelor și a acizilor nucleici, fapt ce afectează atât formarea globulelor sanguine cât și sistemul nervos a cărui dereglare determină degenerarea progresivă a axonilor nervilor spinali și ai nervilor inimii, cu apariția paraliziilor. Concomitent cu reducerea conținutului vitaminei B_{12} din ficat și sânge, crește foarte puternic activitatea lactatdehidrogenazei din ser, crește de asemenea excreția prin urină a acidului metilmalonic. În stări de carență vitaminică B_{12}, alături de anemia pernicioasă, apare sprue tropical, afectiune care se datorește lipsei factorului intrinsec.

Hipervitaminoză. Omul și animalele suportă cantități mari de vitamină B_{12}, întrucât aceasta nu prezintă toxicitate. Nu s-au semnalat cazuri de hipervitaminoză la oamenii care consumă produse alimentare naturale, echilibrate și variate sub aspect nutritiv.

Administrarea unor doze mari de vitamina B_{12} o perioadă îndelun-

Scanned with OKEN Scanner

gată pot provoca stare de hipervitaminoză caracterizată prin hiperglobulie și prin apariția unor stări alergice. La șobolani, prin administrarea intramusculară a unor doze de 0,5 la 1 μg/șobolan, s-au observat slabe schimbări în splină, pierderea structurii foliculilor, vacuolarea și degradarea limfocitelor. A crescut în mod abundent numărul megacariocitelor în splină, iar multe dintre acestea aveau nucleii dilatați (umflați). La șoareci, doze de 100 la 1 600 mg/kg corp, administrate intraperitoneal și respectiv intravenos nu au determinat efecte toxice la nici un șoarece. Toleranța vitaminei B_{12} este în general, foarte bună. Cazurile de alergie care s-au raportat se datoresc probabil unor impurități proteice. Nu s-au raportat până în prezent cazuri de hipervitaminoză B_{12} la oameni și la animale, afară de cazurile experimentale. La oameni nu s-au semnalat simptome adverse la administrarea unei doze orale de 100 mg de vitamină B_{12} și nici la administrarea unor doze cronice de 1 mg timp de 5 ani de zile. Nu s-au semnalat până în prezent efecte mutagene, cancerigene și nici teratogene ale vitaminei B_{12}.

10.9. INTERRELAȚII VITAMINICE

Între vitamina B_{12} și acizii folici există o interdependență foarte accentuată, atât în ce privește rolul și activitatea lor biochimică în diferite procese metabolice, cât și în ce privește metabolismul lor propriu. Această interrelație strânsă cu acizii folici se manifestă în reacțiile de metilare, formilare, în transportul unităților C_1, a hidrogenului, precum și în acțiunea acestor vitamine în biosinteza acizilor nucleici și a proteinelor, în formarea globulelor sanguine, funcționarea sistemului nervos, în procesele de creștere etc. În procesul de eritropoieză, acțiunea vitaminei B_{12} se pare că este indirectă, prin efectul ce-l manifestă asupra acidului pteroilglutamic care reglează în mod direct hematopoieza. În lipsa vitaminei B_{12} din celule, acizii folici nu își pot îndeplini rolul de transportori de unități C_1 și se acumulează acidul N-5-metiltetrahidrofolic (N-5-CH_3-FH_4). În acest proces, vitamina B_{12} îndeplinește rolul de acceptor de hidrogen. În stări carențiale ale acidului folic se instalează și o carență de vitamina B_{12} și invers. Vitamina B_{12} controlează și stimulează transportul unităților C_1 (-CH_3, HC=O, -CH_2OH etc.) de către acizii folinici. În stări de carență folinică scade simțitor conținutul vitaminei B_{12} din ficat, rinichi, splină și sânge.

La *Tetrahymena piriformis* scad necesitățile în acidul folic dacă vitamina B_{12} are un conținut ceva mai ridicat.

În stări carențiale simultane, atât a vitaminei B_{12} cât și a acizilor folici s-a remarcat o incorporare mult mai redusă a ^{14}C-metanolului la animale. Aceste două vitamine au un efect sinergic și aditiv în ce privește formarea eritrocitelor, creșterea păsărilor, șobolanilor, porcilor, iepurilor etc. Administrarea vitaminei B_{12} în carența folinică produce o remisie hematologică, dar nu are capacitatea de-a face reversibile procesele care însoțesc anemia pernicioasă și nici eventualele paralizii determinate de carența folinică (HARRIS, 1955).

Administrarea vitaminei B_{12} la șobolani, aflați în stare carențială a acidului folic, diminuează în mod substanțial eliminarea prin urină a

Scanned with OKEN Scanner

acidului formininoglutamic, un excelent donator de grupări formilice, care se formează la bacterii și animale din histidină, prin degradarea acesteia.

Vitamina B_{12} stimulează formarea vitaminei A din carotenoide și are o acțiune sinergică cu acidul pantotenic în numeroase procese biologice.

Vitamina B_2 are o acțiune de stimulare a biosintezei vitaminei B_{12} de către microflora intestinală. Cianocobamida corectează pierderile de azot care rezultă din acțiunea tiroxinei. Vitamina B_{12} are o acțiune lipotropă în organismele animale, având corelații metabolice cu coenzima A. În stări de hipovitaminoză B_{12} se produce o scădere a concentrației coenzime A din ficat și rinichi la șobolan. De asemenea, vitamina B_{12} are un rol important în formarea colinei din glicocol.

O interrelație metabolică accentuată se stabilește și între colină și vitamina B_{12} care au acțiune sinergică și se „suplinesc" în unele procese metabolice. Astfel, administrarea vitaminei B_{12} la șobolani aflați în hipovitaminoză colinică determină normalizarea creșterii și înlăturarea multor simptome carențiale. Pe de altă parte, colina stimulează procesele de metilare dependente de vitamina B_{12}. Se pare că cele două vitamine participă în comun în biosinteza și transferul grupărilor C_1.

La șobolani aflați în carență de vitamina B_{12} se produce o scădere a concentrației enzimelor flavinice care conțin FAD și a grupărilor -SH totale din sânge și diferite țesuturi și organe, iar în ficat se produce o creștere a acidului pantotenic și a HS-CoA. În stări de hipervitaminoză experimentală, procesul este invers, cu micșorarea acidului pantotenic din ficat.

Există indicații că unele medicamente (neuropsihice, barbiturice, etilfenacetamida etc.) au un efect detrimental asupra metabolismului vitaminei B_{12} și asupra biosintezei factorului intrinsec. De asemenea unele medicamente antidiabetice cu structură guanidinică și acidul p-aminosalicilic au o acțiune antagonistă față de vitamina B_{12}, împiedicând astfel absorbția acesteia.

10.10. ANTIVITAMINE

Stabilirea antivitaminelor B_{12} s-a făcut cu destulă greutate, deoarece același compus în funcție de specie, concentrație, condiții de mediu diferite se poate comporta ca vitamină, antivitamină sau fără acțiune biologică. Dintre compușii cu activitate antivitaminică cianocobamidică se pot menționa analogii structurali care provin prin înlocuirea izopropanolaminei (sau dereglarea structurii acesteia), cei formați prin eliminarea atomului de Co din molecula vitaminei B_{12}, precum și cei proveniți prin înlocuirea adenozinei cu grupări alchil, diacetil etc. Acțiune antivitaminică au și eterii vitaminei B_{12}, acizii monocarboxilici ai acestei vitamine, hidrazidele și anilidele acidului cobamidic, produșii obținuți prin hidroliză acidă a vitaminei B_{12} în prezența apei oxigenate. De asemenea, unii analogi și heterologi structurali ai 5,6-dimetilbenzimidazolului pot intra în competiție cu acesta în procesul de biosin-

Scanned with OKEN Scanner

teză a vitaminei B_{12}. Dintre compușii structurali fac parte 2,6-dimetilbenzimidazolul; 4,5,6-triclorbenzimidazolul; 1,2-dimetil-4,5-diaminobenzoldiclorhidrat; 1,2-diclor-4-nitro-5-hidroxibenzol, diferite ribozidpurine. 4-mercaptopteridina, derivați ai nicotinamidei etc. (BEDELEANU, 1985).

În funcție de specie și doza de administrare acești compuși pot determina inhibarea biosintezei vitaminei B_{12}, cu sau fără inhibarea creșterii organismelor, inhibarea absorbției vitaminei B_{12} și a biosintezei factorului intrinsec, inhibarea diviziunii celulelor implicate în eritropoieză și a diviziunii celulelor tumorale în culturi de țesuturi.

Antivitamine B_{12} sunt folosite și în cercetări clinice și biochimice, mai ales în bacteriologie.

10.11. ASPECTE TERAPEUTICE ȘI FARMACOLOGICE

Preparatele farmaceutice cu vitamină B_{12} se folosesc pentru combaterea anemiilor (pernicioase, megaloblastice, macrocitare), în afecțiuni digestive, toxiinfecții, operații extinse la stomac și intestin. Tratamentele se aplică cu 50 μg/zi în cazul afecțiunilor mai ușoare și cu doze de 1—2 mg/zi în cazuri mai grave, în hepatite epidemice, în ciroze, astenii, polinevrite, nevralgii ale trigemenului, în alcoolism, zona Zoster, boli de iradiație.

Tratamentele cu vitamina B_{12} în doze terapeutice se recomandă de asemenea în tulburările de creștere și în debilitate la copii, în stări de denutriție, osteoporoză, în intoxicațiile cu plumb, în geriatrie etc.

La pacienții cu dereglări ale secreției factorului intrinsec se fac tratamente cu vitamina B_{12} administrată în doze de 150 μg/zi, iar în cazuri mai grave se aplică oral în doze de 1 000 μg/zi, atât sub formă de cianocobamidă, cât și de hidroxicobamidă. Tratamentele efectuate pe cale parentală sunt mai preferate decât cele aplicate pe cale orală. Tratamentele cu hidroxicobamidă s-au efectuat prin injecții, în doze de 1 000 μg de două ori pe săptămână, timp de 6 săptămâni. Hidroxicobamida este mai bine reținută în organism decât cianocobamida și este preferată pentru tratamente de rutină. Vitamina B_{12} se folosește și în tratamentul tabagismului și în unele afecțiuni oculare în doze de 1000 μg de hidroxicobamidă. În tratamentele neurooptice, hidroxicobamida se administrează împreună cu cloramfenicolul și piridoxină. Tratamente cu vitaminele B_{12} și B_6 se fac și în cazul intoxicațiilor cu cianuri, fericianuri, în aciduria metilmalonică etc.

Vitamina B_{12} se folosește ca adaos la obținerea unor preparate alimentare (produse de patiserie, băuturi, preparate dietetice etc.) cu valoare biologică mai ridicată. Alimentele cu conținut mai ridicat de vitamina B_{12} sunt recomandate mai ales la oamenii vegetarieni.

În farmacii vitamina B_{12} se găsește ca soluție injectabilă, în fiole ce conțin 10, 15 sau 30 μg/g. Unele fiole conțin vitamina B_{12} extract de ficat și fier.

Vitamina B_{12} se găsește și sub formă de tablete (20 μg), împreună cu factorul intrinsec, extras din mucoasa gastrică de porc.

Scanned with OKEN Scanner

Întrucât depozitarea vitaminei B_{12} în ficat este limitată, atât ca timp cât și ca greutate (la unii bolnavi doar 10—12 zile), se administrează 3—4 injecții intramusculare de vitamină B_{12}, în doze de 15—30 μg, care asigură necesitățile organismului, realizându-se astfel un tratament de întreținere. În anemii complicate cu tulburări nervoase, în afecțiuni neurologice, tratamentele sunt de durată mai lungă. Tratarea hepatopatiilor cu doze mari de vitamina B_{12}, de până la 2500 μg/zi s-au abandonat din 1960, la recomandarea mai multor cercetători.

Scanned with OKEN Scanner

Capitolul 11. VITAMINA PP

11.1. Scurt istoric 276
11.2. Structură şi activitate 277
11.3. Sinteza şi biogeneza vitaminei PP 280
11.3.1. Sinteză şi izolare 280
11.3.2. Biogeneză 282
11.4. Proprietăţi fizice şi chimice 286
11.5. Metode de identificare şi dozare 286
11.6. Răspândire în natură 288
11.7. Absorbţie, excreţie şi necesităţi 291
11.8. Rol şi acţiune biochimică 292
11.9. Hipovitaminoze şi hipervitaminoze 295
11.10. Interrelaţii vitaminice 298
11.11. Antivitamine 299
11.12. Indicaţii terapeutice şi produse farmaceutice 299

Vitamina PP este cunoscută şi sub denumirea de *vitamină antipelagroasă* (pellagra preventivae), *nicotinamidă* (amida acidului nicotinic), *niacinamidă, vitamina* B_4, *factor PP* (Pellagra-preventiae factor) etc. În prezent vitamina PP este reprezentată de *acidul nicotinic* sau *niacina* şi de amida sa, *nicotinamida* sau *niacinamida*. Formele active ale vitaminei PP sunt coenzimele *nicotinamidadenindinucleotid* (NAD) şi *nicotinamidadenindinucleotidfosfat* (NADP). Unii cercetători susţin că adevărata vitamină PP este nicotinamida, iar acidul nicotinic este o previtamină. În lipsa acidului nicotinic şi a nicotinamidei din alimentaţie, apare la om şi la animale pelagra, boală care se manifestă prin tulburări cutanante, digestive şi nervoase. Niacinamida se găseşte în toate celulele vii ca o componentă structurală a coenzimelor NAD şi NADP, cu rol fundamental în numeroase procese metabolice.

11.1. SCURT ISTORIC

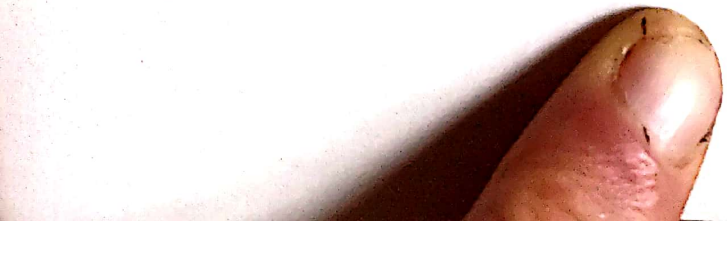
Pelagra a fost menţionată prima dată ca boală în 1216, într-un tratat de medicină chinezesc. Ulterior pelagra a fost descrisă sub numele de „mal de la rosa" de către *G. Cassal* în 1730 şi *I. Thyeri* în 1755. Sub denumirea „pella-agra" (piele aspră), pelagra a fost descrisă de

Fr. Frapolli în 1771, iar mai târziu „scorbut italian" de *G. B. Marzzoni* în 1810, datorită apariţiei acestei boli la bolnavii din azile hrăniţi cu multe preparate din porumb şi cu puţină carne. S-a apreciat că pelagra apare la oameni datorită lipsei din hrana acestora a unui factor alimentar care previne pelagra, numit factor PP (pelagra — preventing factor), iar mai târziu vitamina PP. Prima descriere a acidului nicotinic a fost efectuată de *C. Huber* în 1867 (ROCHE, 1994). O descriere amănunţită a structurii acidului nicotinic, a sărurilor şi a derivaţilor acestuia a realizat-o *Weidel* în 1873. În 1894 *H. von Engler* reuşeşte să prepare nicotinamida, iar în 1913 *C. Funck* reuşeşte să izoleze acidul nicotinic din drojdii. În 1915, *Goldberger* demonstrează că pelagra este o boală determinată de lipsa unor principii alimentare în hrană. *Goldberger* susţine că boala nu este infecţioasă, ea apare în urma unui consum mai îndelungat de amidon degradat şi poate fi prevenită prin suplimentarea hranei cu carne, ouă, lapte. În 1926, *J. Goldberger* şi *R. D. Lillie,* descoperă că la câini în lipsa din hrană a unor compuşi nicotinici apare „limba neagră", afecţiuni hematologice, afecţiuni ale sistemului nervos central şi periferic, ficat gras etc., afecţiuni care se vindecă prin administrarea unor raţii alimentare cu conţinut ridicat de triptofan, cisteină şi a unui factor termostabil izolat din drojdia de bere. Ulterior acest factor a fost identificat cu acidul nicotinic şi cu nicotinamida. În 1937, *C. A. Elvehjem* reuşeşte să vindece „limba neagră" la câini cu acid nicotinic şi nicotinamidă, date în hrana animalelor, cu precizarea că aceşti compuşi se găsesc şi în „prima vitamină" impură (B_1), extrasă din cojile de orez. *T. D. Spies* arată în 1938 că acidul nicotinic vindecă pelagra umană. Acidul nicotinic a fost obţinut prin sinteză de *C. Huber* în 1887, prin oxidarea nicotinei. *W. A. Krehl* descoperă în 1945 că triptofanul este transformat în nicacină, în corpul mamiferelor. În 1955, *M. K. Horwitt* stabileşte conceptul de niacin-echivalenţi, iar *Altschul* şi colab. raportează că dozele mari de acid nicotinic reduc nivelul colesterolului din serul uman. *W. F. Tanner* şi colab. au demonstrat în 1961 că dintre derivaţii niacinei, cel mai bine este absorbită niacinamida, iar în 1979 *G. Shepperd* şi colab. raportează că dozele mari de acid nicotinic determină o reducere a concentraţiei colesterolului şi a trigliceridelor din sânge, iar *Bredehorst* şi colab., în 1980 arată rolul stimulator al niacinei în formarea ribozomilor.

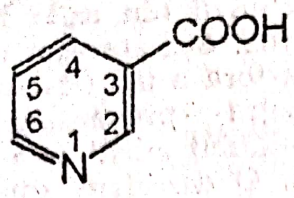
D. Bedeleanu, 1985, arată că importante contribuţii cu privire la etiopatogenia pelagrei, cu accente pe cauzele social-economice, formele de manifestare, mijloacele de profilaxie şi terapie au adus medicii şi cercetătorii români *I. Theodori* (De Pelagra, Berlin, 1858), *V. Babeş* şi *V. Sion* (Die Pellagra, Viena, 1901), *I. Nițulescu* (La therapeutique de la pellagre, Paris, 1938), precum şi renumiţi medici *C. I. Parhon, G. Marinescu, I. Haţieganu, Al. Slătineanu* etc.

11.2. STRUCTURĂ ŞI ACTIVITATE

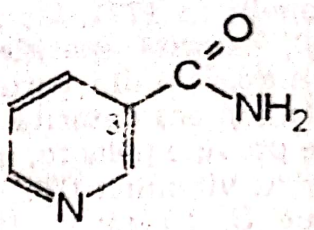
Acidul nicotinic, numit şi niacină sau acid piridin-3-carboxilic şi amida sa, nicotinamida (niacinamida) sau piridin-3-carboxilamida, sunt derivaţi piridinici. Acidul nicotinic are formula moleculară $C_6H_5O_2N$, iar nicotinamida $C_6H_6ON_2$. Formula structurală a acestora se prezintă în figura 11.1.



Scanned with OKEN Scanner



Acid nicotinic



Nicotinamidă

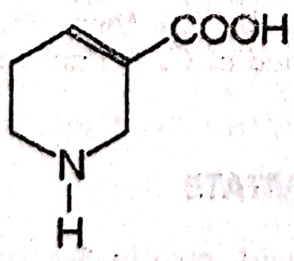
Fig. 11.1. Formula structurală a acidului nicotinic și a nicotinamidei

Acidul nicotinic s-a obținut prima dată în 1867 din nicotină, prin oxidarea acesteia, de unde îi derivă și numele de acid nicotinic. Mai târziu s-a obținut prin oxidarea β-picolinei (3-metilpiridina). Amida acidului nicotinic rezultă din amidarea directă a acidului nicotinic sau a esterilor săi.

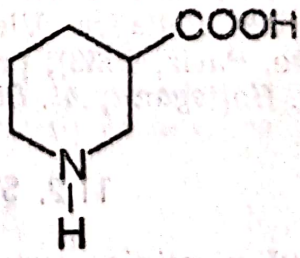
Activitatea biochimică a acidului nicotinic și a nicotinamidei este condiționată de menținerea structurii lor chimice. Alterarea structurilor moleculare poate determina formarea unor noi compuși care sub aspect biologic pot fi activi, inactivi sau antivitamine, efectul lor fiind dependent de natura speciilor asupra cărora acționează (specio-dependent).

În molecula niacinei și a niacinamidei este necesară prezența *ciclului piridinic*, în care N-l să nu fie substituit, sau dacă are un substituent, acesta să fie ușor îndepărtat, deoarece prin intermediul azotului din poziția 1, se stabilește legătura acidului nicotinic cu celelalte componente care intră în constituția coenzimelor NAD și NADP. Derivații N-1 metilați și sub formă de betaine sunt inactivi și reprezintă forme de eliminare. De asemenea, este obligatorie prezența celor trei duble legături conjugate din nucleul piridinic, deoarece prin saturarea totală se transformă în *acid nipecotinic*, iar prin saturare parțială se obține *guvacina*, ambii compuși fiind inactivi biologic (fig. 11.2).

Dintre izomerii acidului nicotinic fac parte *acidul picolinic*, care este inactiv, *acidul izonicotinic* și *hidrazida sa* (HIN), care sunt antivitamine PP și B_6, *acidul chinolenic*, care este un precursor al acidului nicotinic, pe calea biogenezei sale din triptofan (fig. 11.3.). Hidrazida acidului izonicotinic prin substituirea nicotinamidei în coenzimele NAD și NADP formează chelați cu ionii metalici și formează astfel antivitamine PP și B_6 foarte puternice.



Guvacină



Acid nipecotinic
(hexahidronicotinic)

Fig.11.2. Formula structurală a acidului nipecotinic și a guvacinei

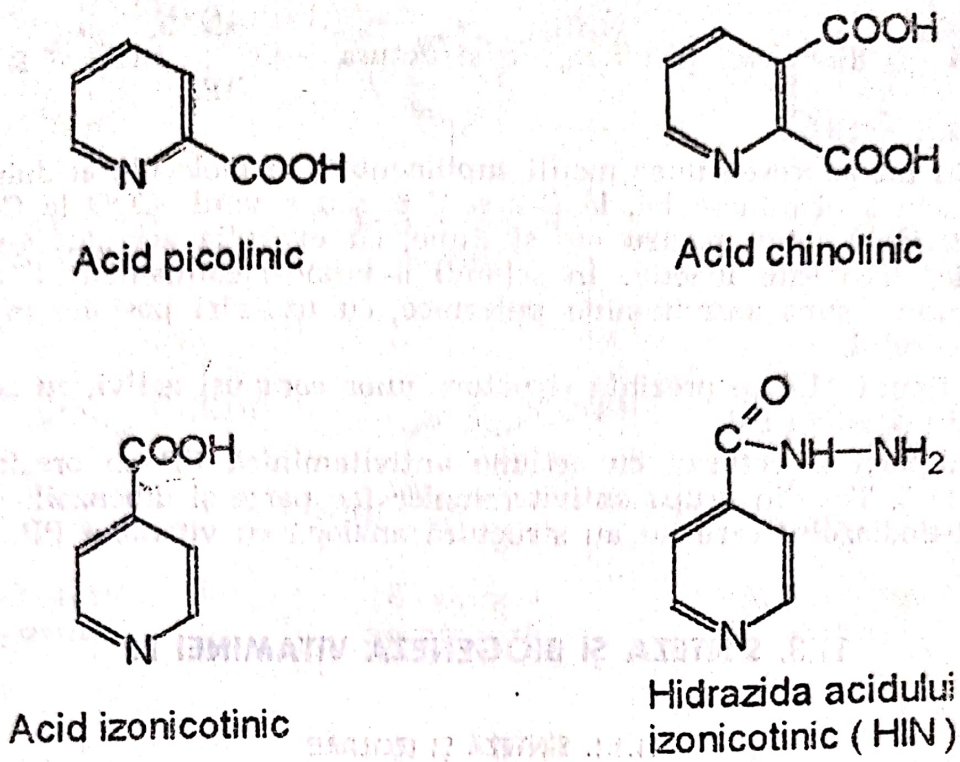


Fig. 11.3. Formulele structurale ale izomerilor acidului nicotinic.

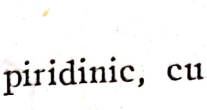
Substituirea grupării amidice totale sau parțiale, de la C-3, din poziția B față de N-1, determină formarea unor compuși analogi, cu activitate biologică diferită, speciodependentă. Acidul nicotinic, nicotinamida și unii esteri ai acidului nicotinic manifestă acțiune vitaminică similară la om, câine, șobolan, iepure, pui de găină etc., dar diferită la microorèanisme și la alte organisme. Astfel, la *C. disenteria,* nicotinamida este de 10 ori mai activă decât niacina.

Prin înlocuirea atomilor de hidrogen din gruparea amidică β-CO-NH_2 (a unuia sau a ambilor atomi de hidrogen) cu -CH_3 sau -C_2H_5, se formează compuși structurali activi pentru om și câine. Prin înlocuirea grupării -NH_2 cu -CH_3 se obține 3-(β)-acetilpiridina (β-CO-CH_3)care este toxică pentru câinele tânăr carențat, provoacă apariția pelagrei la șoarece, moartea embrionilor de găină, dar nu are efecte antagoniste asupra microorganismelor (BREHER, ANTHONY, 1953). În doze mari de 60 mg/zi, acetilpiridina vindecă pelagra canină la animalele adulte. Un dinucleotid cu acetil-3-piridină are efecte inhibitoare asupra NAD.

Prin legarea directă a grupării -NH_2 de ciclul piridinic, în poziția β (C-3) se obține un compus lipsit de activitate biologică.

Derivații sulfonici ai piridinei sau sulfonamidici în poziția β sunt bacteriostatici pentru *Staphilococcus aureus* la concentrații mari și sunt sinergici cu vitamina PP la concentrații mici, iar la colibacili și câine sunt inactivi.

Unii compuși ca piridin-3-sulfat, acid salicilic, nucleotide adeninice inhibă glucodehidrogenaza și lacticodehidrogenaza, enzime NAD-dependente. Din cele prezentate se poate concluziona că un alt component structural obligatoriu în molecula vitaminei PP este prezența unui substituient

la C—3 (β) din ciclul piridinic, cu structura  , în care R să fie —OH sau —NH_2.

Prin introducerea unor metili suplimentari în molecula acidului nicotinic sau a nicotinamidei, la C-2 și C-6, sau a unui -COO la C-5, se obțin derivați activi pentru om și câine, cu excepția acidului 6-metil-nicotinic, care este inactiv. În schimb 6-amino-nicotinamida și acidul 5-F-nicotinic sunt antivitamine puternice, cu utilizări posibile în terapia cancerului.

În figura 11.4 se prezintă structura unor compuși activi, cu acțiune similară vitaminei PP.

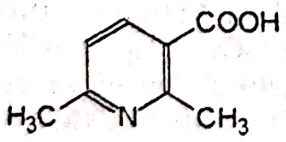
Compușii structurali cu acțiune antivitaminică PP se prezintă în figura 11.5. Tot din grupa antivitaminelor fac parte și dibenzoilmetanul și 1,3,4-tiodiazolul care nu au structură analogă cu vitamina PP.

11.3. SINTEZA ȘI BIOGENEZA VITAMINEI PP

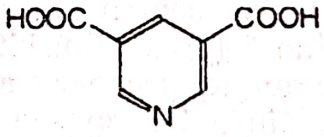
11.3.1. SINTEZĂ ȘI IZOLARE

Acidul nicotinic a fost obținut prin sinteză prima dată de către *C. Huber* în 1867 din nicotină, prin oxidarea acesteia cu oxidanți puternici ca HNO_3, $KMnO_4$, H_2CrO_4.

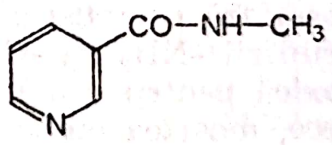
Ulterior acidul nicotinic s-a obținut din chinolină, 3-etil-piridină, 3-fenil-piridina prin oxidare la cald, în mediu acid, în prezență de catalizatori (HgO, SeO_2). Cu randamente bune se obține acidul nicotinic din β-picolină, care apare ca un subprodus în gudroanele de cărbune, prin oxidare nitrică și din tribonelină, prin distilare în curent de HCl. Pe cale industrială, acidul nicotinic se obține din 3-picolină, prin oxidarea acesteia în fază de vapori cu aer în prezența oxizilor de vanadiu



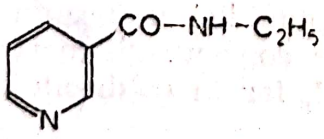
Acid 2,6 - dimetilnicotinic



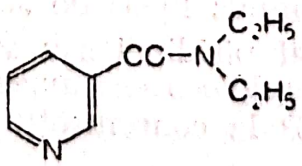
Acid piridin - 3,5 - dicarboxilic (Acid dinicotinic)



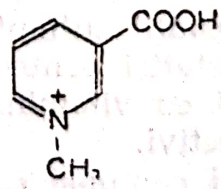
N - metilnicotinamidă



N - etil - nicotinamidă



N - dietil - nicotinamidă



Trigonelină (inactivă - om câine)

Fig. 11.4. Structura unor compuși activi, cu acțiune similară vitaminei PP

Scanned with OKEN Scanner

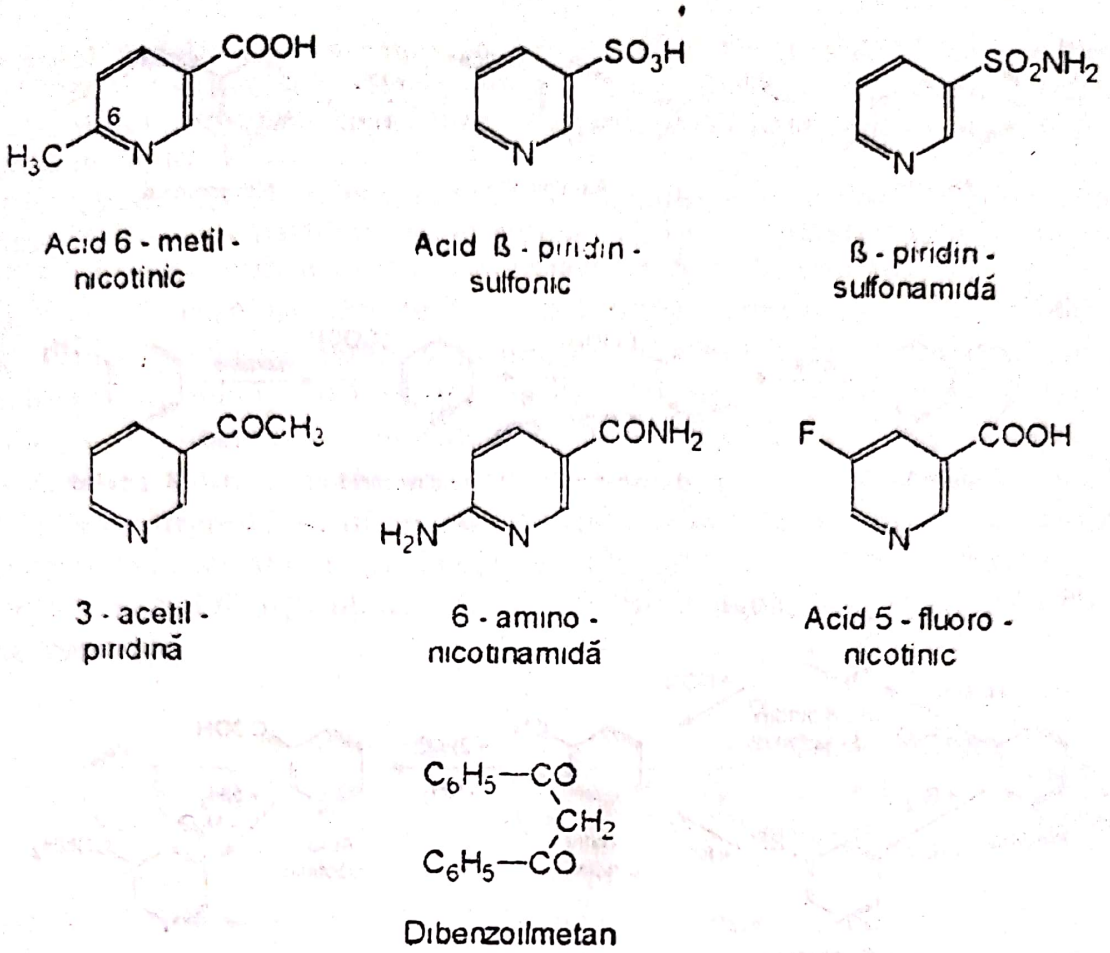


Fig. 11.5. Compuși structurali cu acțiune antivitaminică PP

și fier. Se folosește de asemenea ca materie primă piridina, care prin sulfonare sau bromurare formează compuși intermediari care reacționează cu KCN și formează nitrili. Prin hidroliza nitrililor se formează acidul nicotinic, care prin tratare cu amoniac formează nicotinamida.

Reacțiile principale de formare a acidului nicotinic din nicotină (I), chinolină (II), piridină (III) și trigonelină (IV) se prezintă schematic în figura 11.6.

Nicotinamida s-a obținut prima dată în 1894 prin tratarea nicotiatului de etil cu hidroxid de amoniu concentrat. Din reacție rezultă 3-cianopiridina care încălzită la fierbere cu săruri cuaternare de amoniu formează nicotinamidă cu randament de 86—90%.

Acidul nicotinic și nicotinamida se extrag din produsele naturale în mediu apos, iar extractele obținute se hidrolizează în mediu acid. Produsele de hidroliză se extrag apoi cu solvenți organici (n-butanol, cloroform etc.) Acidul nicotinic se extrage sub formă de esteri sau ca sare de cupru, care se descompune cu H_2S.

Nicotinamida se găsește în produsele naturale predominant sub formă legată. În urma hidrolizei cu acizi a extractelor apoase primare nicotinamida apare în stare liberă și va fi extrasă din hidrolizat cu butanol sau cloroform și se va obține în stare pură prin distilare sub vid.

În organismul uman se găsește acidul nicotinic, nicotinamida, NAD, NADP, iar în urină acidul nicotinic și trigonelina care este lipsită de

Scanned with OKEN Scanner

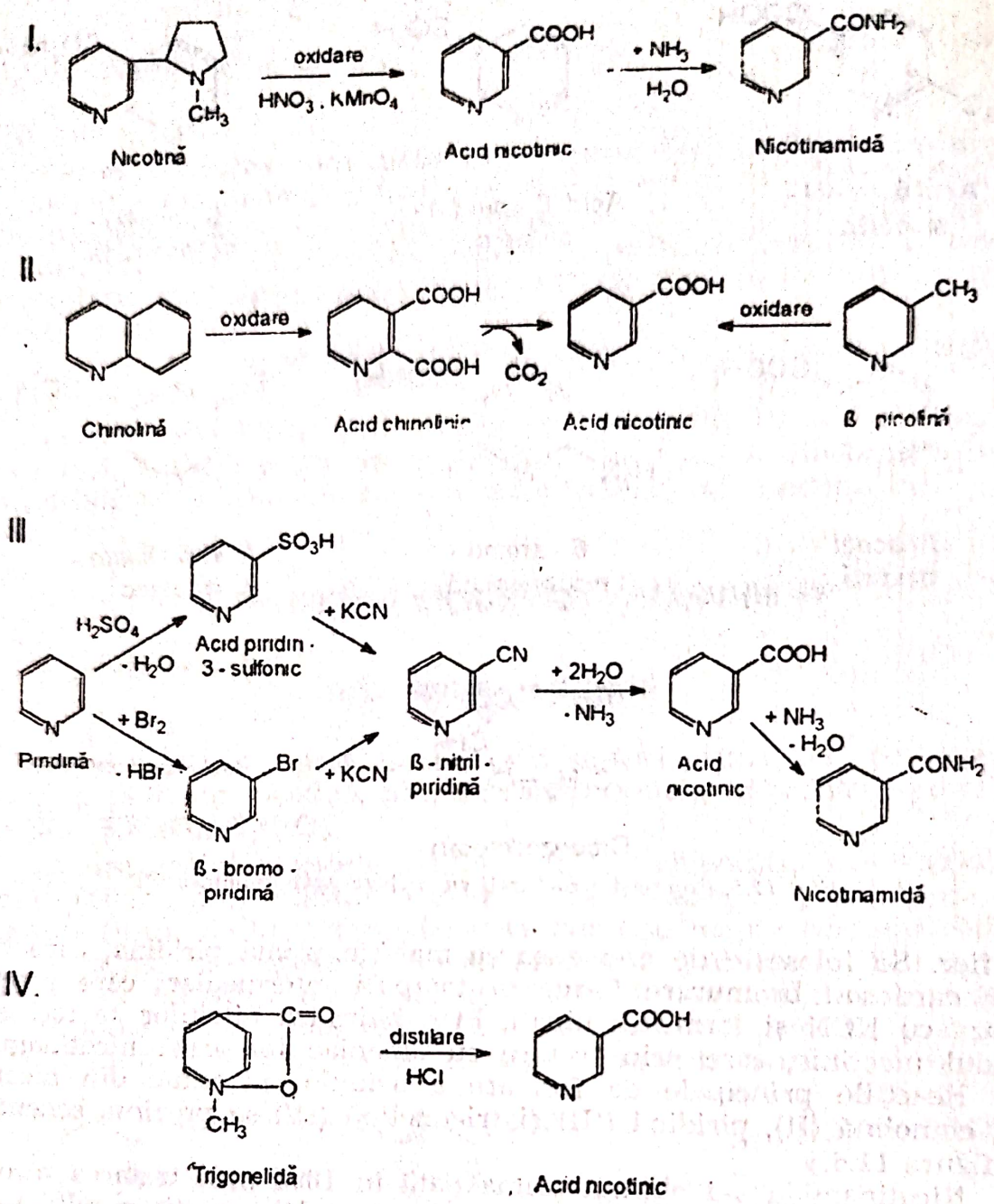


Fig. 11.6. Reacțiile principale de formare a acidului nicotinc din nicotină, chinolină, piridină și trigonelidă

acțiune biologică. Restul compușilor sunt activi sub aspect biochimic. Prin hidroliză slab acidă, coenzimele și amida se transformă în acid nicotinic. Prin hidroliza alcalină se obțin aceiași compuși, dar trigonelina se transformă în compuși activi, ceea ce constituie o sursă de eroare.

11.3.2. BIOGENEZĂ

Precursorul principal al vitaminei PP la om, animale și la unele microorganisme este triptofanul, care îndeplinește rolul de provitamină PP. Biosinteza acidului nicotinic din triptofan a fost confirmată prin experiențe cu atomi marcați. Astfel s-a dovedit că atomul ^{14}C-3 din

nucleul indolic se regăsește în gruparea carboxil a acidului nicotinic, iar ^{15}N-1 din nucleul indolic devine atomul de azot din ciclul piridinic al acidului nicotinic. Biosinteza acidului nicotinic din triptofan se prezintă în figura 11.7.

Transformarea triptofanului în formilkineurină este o reacție enzimatică la care participă și vitamina B_1. În continuarea procesului formilkinurenina, sub acțiunea formilazei se hidrolizează în acid formic și kinurenină, care se găsește în urină după administrarea de triptofan. Kinurenina prin oxidare, în prezența vitaminei B_2 se transformă în 3-hidroxikinurenină, care prin hidroliză formează acidul. 3-hidroxiantranilic și se eliberează o moleculă de α-alanină. Această reacție este catalizată de kinureninază, care are ca și cofactor piridoxalfosfatul. Acidul 3-hidroxiantranilic printr-o reacție de oxidare formează ca și compus intermediar nestabil o „aminoaldehidă", care prin decarboxilare la C-3 formează acidul α-picolinic, iar prin decarboxilare la C-2 formează acidul nicotinic.

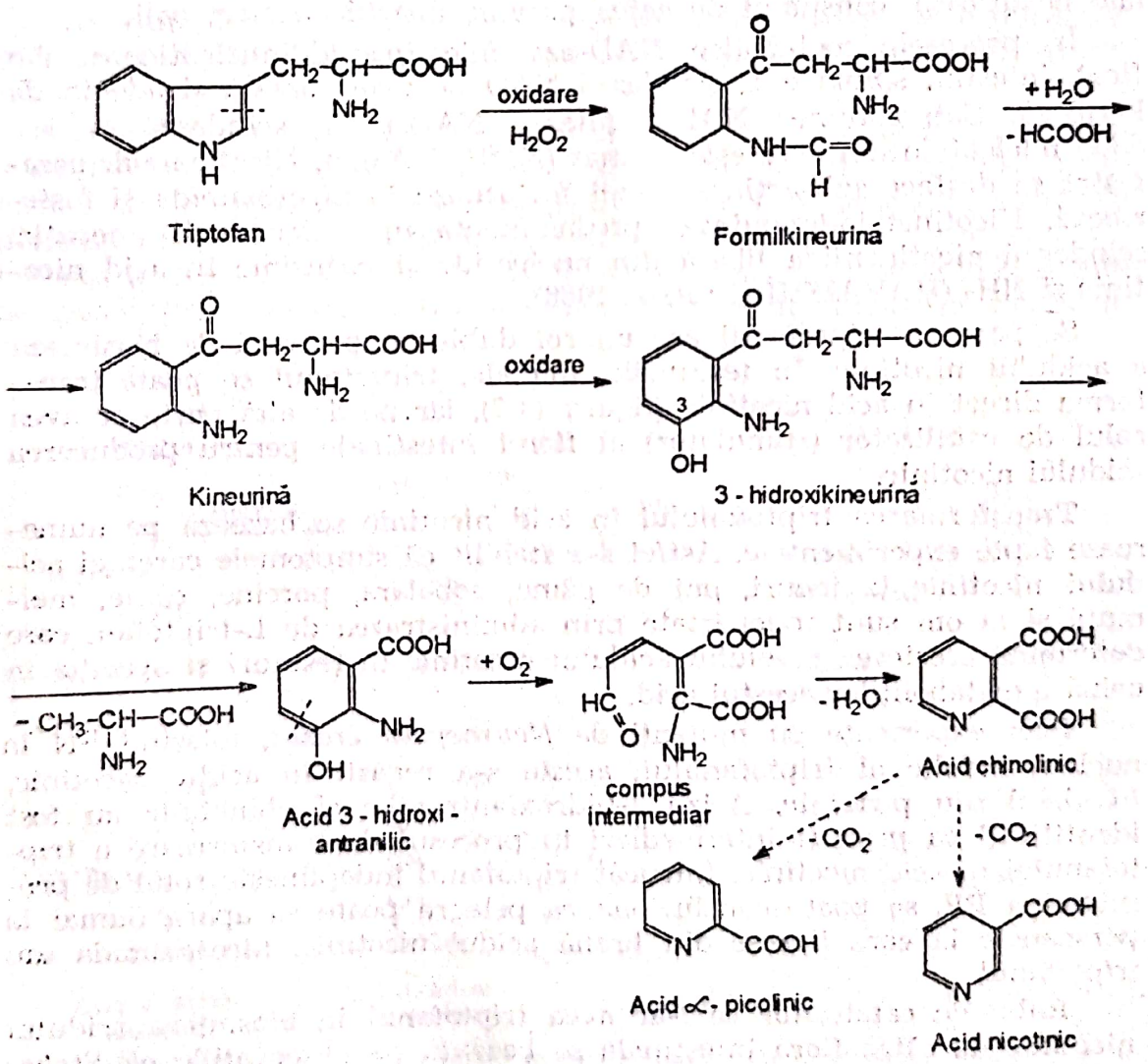


Fig. 11.7. Biosinteza acidului nicotinic din triptofan

Pe cale experimentală s-a stabilit că triptofanul poate înlocui cel puțin parțial vitamina PP atât la om cât și la animale și la microorganismele vitamin-PP dependente. Cercetări pe *Escherichia coli* au stabilit ca precursori eficienți ai niacinei, glicerolul, acidul glutamic, acidul succinic, riboza, adenina etc. Unele microorganisme *(Neurospora crassa, Xanthomonas pruni* etc.) sunt capabile să biosintetizeze vitamina PP, în timp ce alte microorganisme, cum sunt *Staphylococcus aureus, C. diphtheriae, Proteus vulgaris, Acetobacter suboxidans, B. mesentericus, Leoconostoc mesenteroides, C. tetani* etc., au nevoie de acid nicotinic ca factor de creștere.

În unele surse vegetale (boabele cerealelor), acidul nicotinic se găsește sub forma unui complex vitamino-polipeptidic, numit *niagen,* inactiv, cu masa moleculară 13 000, care conține 1% acid nicotinic. Din acest complex acidul nicotinic se eliberează prin hidroliză în mediu alcalin și în tubul digestiv.

În cafea, conținutul acidului nicotinic crește prin prăjire de la 0,6 mg/100 g la 12,7 mg datorită transformării trigonelinei în acid nicotinic, fapt pentru care *Y. Raoul* (1973) afirmă că în regiunile cu edemie pelagroasă, consumul de cafea previne apariția acestei boli.

În procesele metabolice NAD-aza (nicotinamiddinucleotidaza) din ficat, intestin, splină etc., scindează NAD la nicotinamidă și adenin di-P-riboză. Sub acțiunea NAD-fosfatazei, NAD-ul se scindează în cele două nucleotide din care este format (NMP și AMP). Nicotinamidribozofosfat se desface sub acțiunea unei fosforilaze în nicotinamidă și fosforiboză. Nicotinamiddezaminaza predominantă în microzomii hepatici scindează nicotinamida liberă din nucleotide și coenzime în acid nicotinic și NH_3 (HAVAISHI și colab., 1968).

Se pare că triptofanul are un rol dublu în procesul de biosinteză a acidului nicotinic. În țesuturile animale, triptofanul se poate transforma direct în acid nicotinic (figura 11.7), iar pe de altă parte ar avea rolul de catalizator (stimulator) al florei intestinale pentru producerea acidului nicotinic.

Transformarea triptofanului în acid nicotinic se bazează pe numeroase fapte experimentale. Astfel s-a stabilit că simptomele carenței acidului nicotinic la iepuri, pui de găină, șobolani, porcine, câine, maimuță și la om sunt îndepărtate prin administrarea de L-triptofan, care determină creșterea nivelului acidului nicotinic în țesuturi și apariția în urină a metaboliților acestui acid.

Prin experiențe cu mutanți de *Neurospora crassa,* folosind ^{15}N în nucleul indolic al triptofanului, acesta s-a regăsit în acidul nicotinic, în ciclul său piridinic. Acizii 3-hidroxiantranilic și chinolinic au fost identificați ca produși intermediari în procesul de transformare a triptofanului în acid nicotinic. Întrucât triptofanul îndeplinește rolul de provitamină PP, se poate concluziona că pelagra poate să apară numai la persoanele la care lipsesc din hrană acidul nicotinic, nicotinamida sau triptofanul.

Rolul de catalizator ce l-ar avea triptofanul în biosinteza acidului nicotinic de către flora intestinală se bazează pe observațiile că *Escherichia coli* nu poate transforma triptofanul în acid nicotinic în lipsa

Scanned with OKEN Scanner

acidului laetic, în timp ce ornitina, prolina, arginina, acidul glumatic, glutamina sunt rapid transformate în acid nicotinic de același microorganism. În concluzie, precursorii primari ai biosintezei acidului nicotinic, biosintetizat o parte de flora intestinală, sunt ornitina, prolina, acidul glumatic și nu triptofanul.

Transformarea acidului glutamic în acid nicotinic prin intermediul prolinei și al ornitinei la unele microorganisme, se poate realiza conform schemei din figura 11.8, fiind o cale secundară de biosinteză. Cu toate că rolul de provitamină PP al triptofanului este admis de toți cercetătorii, au existat opinii că animalele nu pot transforma triptofanul în acid nicotinic, decât numai flora microbiană intestinală. Aceste opinii au fost infirmate de rezultate experimentale. S-a stabilit că șobolanul realizează conversia triptofanului în acid nicotinic în lipsa florei bacteriene intestinale după îndepărtarea chirurgicală a intestinului. În țesuturile animale și la om există enzime specifice care pot cataliza transfirmarea triptofanului în acid nicotinic. Triptofanul marcat, administrat pe cale parentală se transformă în acid nicotinic, care se incorporează rapid în formele coenzimatice.

La animalele care au capacitatea de a biosintetiza acid nicotinic sursa acestuia în organism o constituie alimentele și microflora intestinală.

La om biosinteza acidului nicotinic se realizează preponderent la nivelul intestinului gros în cantități suficiente pentru necesitățile organismului. Sub influența sulfaguanidinei și a sulfatiazolului, care acționează ca antiseptice intestinale, este redusă drastic biosinteza acidului nicctinic în intestin și excreția N-metilnicotinamidei prin urină. Puii de găină sunt capabili să biosintetizeze 1/6 din necesarul de acid nicotinic.

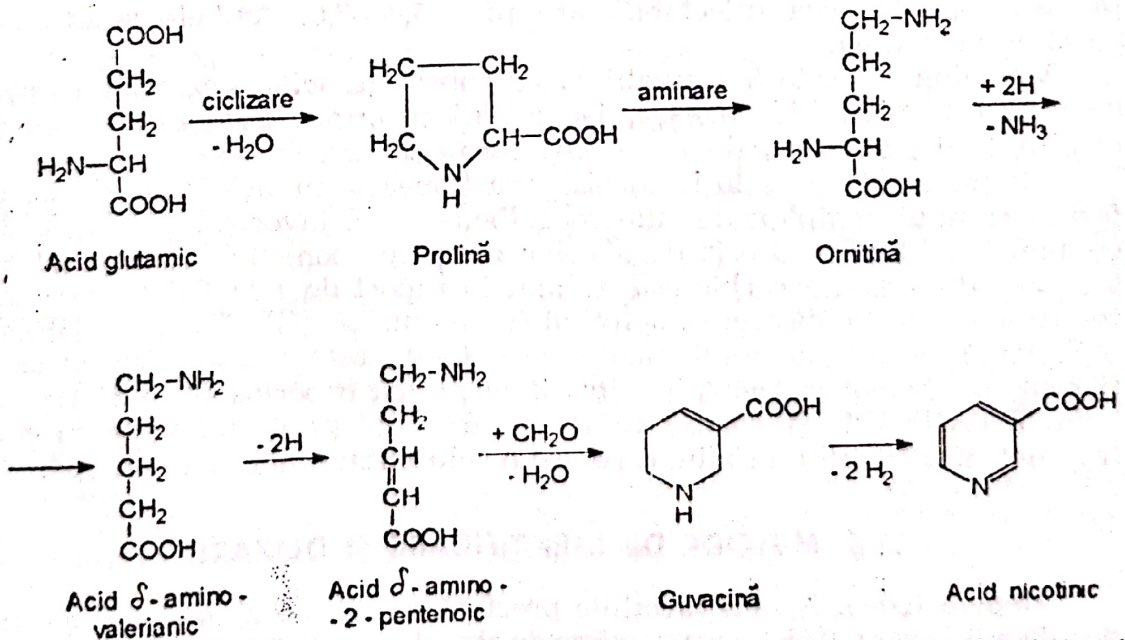


Fig. 11.8. Transformarea acidului g utamic în acid nicotinic prin intermediul prolinei și ornitinei

11.4. PROPRIETĂȚI FIZICE ȘI CHIMICE

Acidul nicotinic este o substanță solidă, se prezintă sub formă de cristale incolore, așezate în timpul cristalizării sub formă de snopi sau pulbere cristalină albă, puțin gălbuie, fără miros, cu gust slab acru, cu punct de topire la 235°C (234—239°). Este puțin solubil în apă și alcool la rece, dar mai solubil la cald. Este greu solubil în eter, benzen, acetonă, cloroform și ușor solubil în hidroxizi și carbonați alcalini. În soluție apoasă prezintă un maxim la 262 nm.

Acidul nicotinic rezistă la aer și la acțiunea agenților oxidanți precum și la temperaturi în jur de 115°C, la fierbere cu acizi și baze 2n. La încălzire în tub închis, la 120°C, se descompune cu formare de piridină și CO_2. Cu bazele minerale și organice, acidul nicotinic formează săruri, iar prin reducere se transformă în acid hexahidronicotinic sau în acid hidroximetilglutaric.

Acidul nicotinic, fiind o substanță cu grupări acide și bazice (N-1 din ciclul piridinic) va reacționa cu diferiți compuși la nivelul amblor grupări. În soluție nu are caracter de amfolit. La nivelul N-1 din ciclul piridinic poate forma combinații cu acizii. Cu HCl formează clorhidrat de acid nicotinic, iar cu bazele alcaline și cu metalele grele formează săruri. Soluțiile apoase sunt slab acide și se pun greu în evidență cu roșu de Congo (pH 3,5).

Nicotinamida se prezintă sub formă de cristale sub șase forme polimorfe, cu punctele de topire la 105, 110, 111, 113, 116 și 129°C, însă numai ultima formă este stabilă. Este solubilă în apă, alcool, glicerol, etilenglicol, acetonă și greu solubilă în eter, cloroform, benzen. Rezistă la autoclavare la 120°C timp de 20 de minute. În mediu acid se transformă în acid nicotinic. Din benzen cristalizează sub formă de cristale aciculare.

Sub aspect farmaceutic, acidul nicotinic și nicotinamida sunt considerate cele mai stabile vitamine. Soluția apoasă 5% a acestora are pH 6,0—8,0, iar cea injectabilă are pH 5,0—7,0. Ambele soluții suportă autoclavarea.

Vitamina PP este incompatibilă cu substanțe acide sau bazice, deoarece nicotinamida hidrolizează, iar acidul nicotinic formează săruri în mediul bazic. Cu sărurile de argint formează precipitate.

Vitamina PP în soluție apoasă reacționează cu acidul ascorbic, cu formarea unui complex de culoare galben-verde, favorizat la pH de 3,8 cu punct de topire diferit de a celor două componente. Complexul vitamină PP — acid ascorbic este format în raport de 1 la 1 din cele două componente și își păstrează activitatea vitaminică (GUTTNIAN, BROCKE, 1963). Soluția acidului nicotinic de 4,49% este izoosmotică cu serul și cauzează hemoliza 100% a eritrocitelor, după o perioadă de 45 de minute (STĂNESCU și colab., 1981). Pentru injecții se folosește în mod frecvent nicotinatul de sodiu, care are o solubilitate mai mare în apă.

11.5. METODE DE IDENTIFICARE ȘI DOZARE

Metode fizice. Acidul nicotinic prezintă în soluție apoasă un spectru de absorbție caracteristic, cu maxime de absorbție la 237 (minim) și 262 nm (maxim). Formele oxidate și reduse ale coenzimelor NAD și NADP prezintă

Scanned with OKEN Scanner

spectre de absorbție diferite, care servesc la identificarea și dozarea acestor coenzime. NAD^+ și $NADP^+$ au un maxim de absorbție la 260 nm, iar $NADH+H^+$ și $NADPH+H^+$ au două maxime de absorbție, unul la 260 nm iar celălalt mai puțin extins la 340 nm. Transformarea reciprocă a formelor oxidate în forme reduse și invers ale acestor coenzime se poate urmări prin „teste optice", larg utilizate în laboratorul clinic.

Nicotinamida se poate determina prin metode fluorimetrice și polarimetrice. Prin metode cromatografice se relaizează separarea și identificarea diferitelor forme vitaminice PP (acid nicotinic, nicotinamidă, NAD. NADP).

Metode chimice. Toți compușii piridinici care conțin un atom de azot terțiar, dau cu cloruri acide compuși cuaternari, săruri de piridiu, care cu bazele formează compuși colorați. Aceste reacții de culoare sunt caracteristice nucleului piridinic. Astfel, compușii piridinici reacționează cu 2,4-dinitrobenzenul și formează compuși colorați în roșu-violaceu, care se pot colorimetra.

Experimental, acidul nicotinic se topește cu 2, 4-dinitrobenzen, produsul obținut se dizolvă în apă sau eter în cazul nicotinamidei, apoi se tratează cu soluție 1% de NaOH și se obține o culoare intensă roșie-violacee. Complexul format se poate doza prin colorimetrare.

Pentru dozarea vitaminei PP din alimente sau lichide biologice, se folosește reacția de culoare pe care o dau compușii piridinici cu bromura de cianogen și cu aminele primare sau secundare, obținându-se compuși colorați în galben portocaliu. Nucleul piridinic se rupe cu formare de compuși colorați, obținându-se și aldehida glutaconică ($O=C-CH=CH-CH_2-C=O$). Dintre compușii aminici care se pot utiliza în aceste reacții fac parte β-naftilamina, anilina, 4-metilaminofenol (metol), p-aminoacetofenona, clorhidrat de procaină, acid p-aminobenzoic, acid barbituric etc.

Trigonelina și piridoxina nu dau reacții de culoare, în timp ce toate formele vitaminice PP, ß-picolina, nicotina, coramina etc., dau colorații galben-portocalii, de diferite intensități.

Nicotinamida dă o colorație galbenă de trei ori mai slabă decât acidul nicotinic. În cazul utilizării aminelor, colorația variază în funcție de felul acestora. Niacina dă cu anilina o colorație aglben-verzuie, iar cu naftilamina o culoare galbenă. Cu acidul 2,5-amino-naftolsulfuric se obține o culoare roșie. Acidul nicotinic dă cu glucoza la cald, colorații brune.

Cu ajutorul acidului sulfanilic sau a acidului 2-naftilamino-1-sulfonic se poate realiza dozarea diferențiată a aciduluui nicotinic și a nicotinamidei.

Pentru dozările biologice ale vitaminei PP extractele primare din sursele naturale (alimente, lichide biologice, plante etc.) se hidrolizează în mediu acid, apoi compușii vitaminici se extrag cu solvenți organici, se purifică și se dozează colorimetric sau spectrofotometric.

Metodele biologice sunt mai eficace și mai sensibile decât cele chimice. Ele se bazează pe relația dintre cantitatea de vitamină PP pusă

Scanned with OKEN Scanner

într-un mediu de cultură și numărul de bacterii care cresc și se dezvoltă. Vitamina PP este un factor de creștere pentru numeroase microorganisme. Pentru *Shigella paradisenteriae* și *Proteus vulgaris*, vitamina PP este eficientă la o concentrație de 0,3μg/100 ml, iar pentru *Tetrahimena piriformis*, *Lactobacillus arabinosus* la 0,4 μg/100 ml, cu avantajul de-a nu se interfera cu triprofanul și metaboliții săi, care acționează sinergic cu vitamina PP la om și la animale. *Leuconostoc mesenteroides* este activ numai sub acțiunea acidului nicotinic, dar nu și a nicotinamidei, fapt ce permite diferențierea celor doi compuși.

Încă din 1918 s-a remarcat că acidul nicotinic este un bun factor de creștere pentru unele microorganisme. Pentru dozări biologice este folosit frecvent *Lactobacillus arabinosus*, care este sensibil la toate formele vitaminice PP (acid nicotinic, nicotinamidă, coenzime NAD, NADP), la acidul nicutinuric, a niagenului din grăunțele cerealelor. Este insensibil însă la acțiunea trigonelinei, arecolinei, metilnicotinamidei și coraminei.

Metodele biochimice și clinice se bazează pe determinarea conținutului vitaminei PP din sânge și din urină, precum și a metaboliților acestora (trigouchină, N-metil-nicotinamida etc.). La un aport alimentar de 50—200 mg vitamină PP se elimină prin urină 20% în 24 de ore.

11.6. RĂSPÂNDIRE ÎN NATURĂ

Vitamina PP se găsește sub diferitele sale forme structurale larg răspândită în natură atât în organismele vegetale, cât și în cele animale. În plante conținutul vitaminelor piridinice este mai mic decât la animale. Există totuși surse vegetale, ca drojdia de bere, care conțin o cantitate mai mare de acid nicotinic, fapt ce a determinat utilizarea acestor surse în tratamentul pelagrei. Într-o drojdie selecționată folosită la fabricarea berii s-au găsit acid nicotinic cu un conținut de 106 mg/100 g s.u., iar în drojdiile folosite la fabricarea pâinii 30 mg/100 g s.u.

Vitamina PP se găsește atât în stare liberă, sub formă de acid nicotinic, care se găsește în cantitate mai mare la plante, sub formă de ninotinamidă, care predomină cantitativ la organismele animale, precum și sub formă de coenzime NAD și NADP, care sunt prezente în toate celulele, având un rol esențial în procese metabolice fundamentale. La plante sunt mai bogate în vitamina PP frunzele și mai sărace legumele, fructele și semințele unor cereale (secară, porumb etc.). Conținutul vitaminei PP în plante ierboase variază între 30—60 μg/g material proaspăt. În produsele cerealiere (grâu, porumb, orz, orez etc.) acidul nicotinic se găsește legat de unele componente ale boabelor și astfel nu este liposolubil, decât numai în urma unor procese de hidroliză.

Triptofanul, considerat ca provitamina PP contribuie cu 2/3 din necesarul de vitamină PP pentru adulți, în unele preparate dietetice. Importante surse de triptofan sunt carnea, laptele și ouăle.

La cereale, coaja bobului conține mai mult acid nicotinic decât miezul. Întrucât acidul nicotinic și amida sa nu sunt sensibili la fierbere și sterilizare, face ca cea mai mare parte din vitamina PP să se păstreze în alimente și după prepararea acestora. În general, în timpul preparării hranei, pierderea de vitamină PP este în jur de 30%.

Scanned with OKEN Scanner

Mamiferele conţin în general 4—5 mg/100 g ţesut proaspăt. Dintre organele mai bogate în vitamina PP fac parte ficatul (16—17 mg%), rinichiul (7 mg%), inima (5,5 mg%).

Conţinutul vitaminei PP din unele produse vegetale şi animale se prezintă în tabelul 11.1.

După cum rezultă din datele prezentate în tabelul 11.1, vitamina PP se află în cantitate mai mare în drojdii, tărâţele şi germenii cerealelor, făina de malţ, iar în cantităţi mai reduse în varză, nuci, morcovi, spanac, castraveţi, mazăre, cartofi etc. Laptele, vinul şi berea sunt sărace în această vitamină. Conţinutul mai ridicat de vitamină în făina de cazeină lactică se explică prin adsorbţia vitaminei PP de proteine în coagularea laptelui în mediu acid, iar conţinutul extrem de redus în unt se datoreşte insolubilităţii vitaminei în grăsimi. Conţinutul vitaminei PP în sângele total este de 0,4—0,8 mg/100 ml, în eritrocite 1,3 mg%, iar în plasmă de 0,025—0,15 mg%. Valori sub 0,5 mg% în sânge apar în stări carenţiale. Dintre formele vitaminice PP în sânge predomină coenzimele NAD şi NADP, care se găsesc în globulele albe 10%, iar nicotinamida în stare liberă se află în plasmă în proporţie de

Tabelul 11.1

Conţinutul vitaminei PP din unele produse vegetale şi animale, în mg/100g

Produs	Vitamina PP mg/100 g
Drojdie de bere	30 —106
Extract de drojdie	65 — 80
Tărâţe de orez	42 — 96
Extract de malţ	8 — 10
Grâu boabe	6 — 7
Germeni de grâu	5 — 53
Făină de grâu	1 — 1,2
Orz încolţit	7,3 — 7,4
Făină de malţ	6 — 7
Părumb boabe	2,01 — 2,14
Făină de porumb	1 — 1,2
Ovăz boabe	1,27 — 3,0
Fulgi de ovăz	1,33 — 1,35
Amidon de grâu	0,36 — 0,40
Făinuri lactate	1,7 — 2,3
Bere	0,45 — 2,7
Vin	0,6 — 0,9
Lapte uman	0,23 — 0,25
Lapte de vacă	0,15 — 0,25
Lapte praf (12% grăsime)	2,2 — 2,4
Unt	0,007— 0,008
Făină de cazeină lactică	1,94 — 1,96
Nuci	3,0 — 6,5
Fasole	1,45 — 1,47
Mazăre	0,1 — 2,4
Morcovi	0,4 — 1,4
Varză albă	4,5 — 4,7
Cartofi	0,9 — 5,5
Tomate	0,4 — 0,6
Spanac	0,45 — 7,65
Castraveţi	0,8 — 8,0

Scanned with OKEN Scanner

10%. Cu toate că NAD și NADP suferă o „uzură" datorită activității lor în diferite procese metabolice, conținutul lor în sânge rămâne relativ constant, datorită coenzimelor din ficat, rinichi, mușchi și alte organe și țesuturi. În stări carențiale se produce o reducere a coenzimelor depozitate în diferite organe (ficat, inimă, splină etc.), în timp ce sângele și creierul păstrează un timp mai îndelungat conținutul normal al acestor coenzime. Scăderea coenzimelor piridinice din ficat în stările carențiale, servește ca metodă de diagnostic clinic.

Nicotinamida se găsește la om și animale predominant sub formă de coenzimă, în ficat în stare liberă sau combinată.

Acidul nicotinic se găsește sub formă de nicotinamidă în structura coenzimelor, ca nicotinamidă de rezervă în ficat și ca nicotinamidă fixată temporar, într-o formă labilă, ușor excretabilă.

O parte mai mică din vitamina PP existentă în organism este produsă de microflora intestinală. Conținutul acidului nicotinic din unele organe, glande și țesuturi animale se prezintă în tabelul 11.2.

La animale, bogate în acid nicotinic sunt glandele suprarenale, ficatul, pancreasul, rinichii, inima, creierul, prostata, placenta și timusul. În țesuturile fătului, cantitatea de vitamină PP este mai mică decât la adulți, atât în ficat, cât și în alte organe, cu excepția inimii, fiind un mușchi în activitate.

Tabelul 11.2

Conținutul acidului nicotinic din organe, glande și țesuturi animale în mg/100 g țesut (după CHIOSA și colab., 1955)

Produs	Cantitatea mg/100 g
Creier de oaie	4,0
Corp galben de vacă	3,5
Ficat de porc	8,7
Antehipofiză de bou	1,3
Glandă mamară de junincă	1,9
Ovar de scroafă	2,7
Placentă de vacă	3,1
Prostată de taur	3,8
Rinichi de porc	5,1
Suprarenală de bou	5,2
Testicul de taur	1,3
Timus de miel	3,5
Inimă de bou	4,6
Epifiză de bou	2,0
Hipofiză de bou (totală)	2,2
Retrohipofiză de bou	2,9
Ovar de junincă	2,4
Pancreas de porc	4,9
Plămâni de porc	4,0
Splină de porc	2,4
Corticosuprarenală de bou	8,0
Medulosuprarenală de bou	9,2
Tiroidă de bou	2,5
Timus de viței	3,1

Scanned with OKEN Scanner

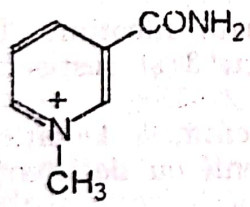
11.7. ABSORBȚIE, EXCREȚIE ȘI NECESITĂȚI

Acidul nicotinic și nicotinamida sunt ușor absorbite la nivelul intestinului subțire și transportate pe cale sanguină la diferite organe și țesuturi. După administrarea orală a 20 mg vitamină PP se observă o creștere rapidă a concentrației acesteia în plasmă. În diferite țesuturi și organe, cea mai mare cantitate de vitamină PP se găsește sub formă de NAD și NADP. Aceste coenzime se formează în sânge, ficat, rinichi, creier etc. Principalul organ de depozit este ficatul, care conține o parte însemnată de vitamină PP biodisponibilă, dar sub formă de acid nicotinic se află în cantitate redusă.

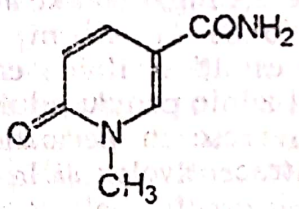
Calea principală de eliminare a vitaminei PP din organism este excreția urinară, sub forma unor compuși (metaboliți) care diferă în funcție de specie. Un om sănătos elimină zilnic prin urină în jur de 4 mg compuși nicotinici, ceea ce revine 0,2 mg% pentru un volum de 2 l urină. Scăderea acestei cantități până la 0,05 mg% indică o stare carențială.

Principalii metaboliți prin care se elimină vitamina PP în urină sunt N-1-metilnicotinamida și lactona sa, cunoscute sub numele de trigonelină (35%), N-1-metil-6-piridon-nicotinamida (40%), niacina, nicotinamida și acid nicotinuric, toate împreună reprezentând 6% din cantitatea totală eliminată. Principalii compuși de eliminare se prezintă în figura 11.9.

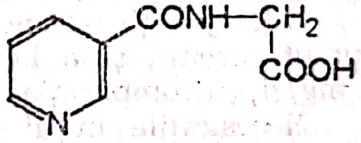
Trigonelida este un alcaloid care se găsește în semințe de *Trigonella foenigraecum, Pisum sativum, Canabis sativa, Strophantus* sp. etc. Conținutul ei crește în urină în urma consumării unor alimente bogate în acest alcaloid, inclusiv în consumul de cafea.



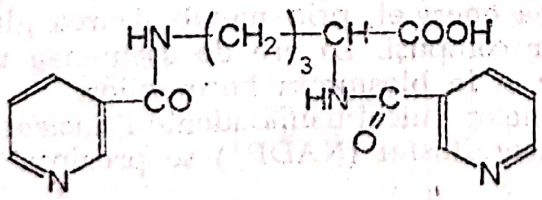
N-$_1$- metil - nicotinamidă



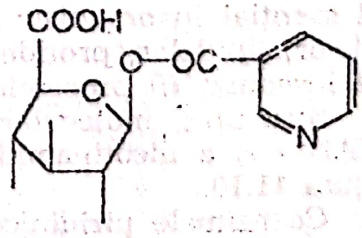
N-$_1$- metil - 6 - oxo - nicotinamidă



Acid nicotinuric



Dinicotinoil - ornitină



Acidul ß - nicotinoil - - D - glucuronic

Fig. 11.9. Principalii compuși de eliminare ai vitaminei PP

În urină s-au mai identificat în cantități mici N-1-metil-4-piridon-carboxilamida, N-1-metil-2-piridon-carboxilamida, 6-hidroxinicotinamida, 6-hidroxiacid nicotinic, nicotinamid-N-oxid (SPARTHAN și colab. 1969).

Valorile sub 1 mg/24 ore de trigonelină eliminată indică o stare de carență PP. La câine, din cantitatea de acid nicotinic injectată, aproximativ 94% se elimină prin urină sub formă de trigonelină, iar la șobolan, tot sub formă de trigonelină 56%, ca acid nicotinic 10%, iar ca N-1-metil-6-piridon-3-carboxamidă 10%. Șoarecele excretă 37% acid nicotinic, 25% acid nicotinuric și 13% trigonelină. Puiul de găină elimină în special produși de conjugare dintre care mai importanți sunt dinicotinoil-ornitina, acid ß-nicotinoil-D-glucuronic, acid nicotinuric etc.

Organismele animale dispun de căi variate de metabolizare a compușilor piridinici. Corpul omului se consideră saturat cu vitamina PP dacă în urina eliminată dimineața, la prima urinare, se găsesc 30 mg de trigonelină, sau dacă după injectarea a 50 mg de nicotinamidă se elimină în decurs de 4 ore prin urină 500 μg de trigonelină (ZEASLEIN, 1982).

Necesitățile de nicotinamidă și acid nicotinic la omul adult sunt estimate între 10 și 20 mg/zi, care sunt asigurate o treime prin alimente și flora intestinală, iar două treimi din triptofan, care îndeplinește rolul de provitamină PP. Randamentul acestei conversii este de 1 mg nicotinamidă din 60 mg de L-triptofan. Cantitatea de vitamină PP depinde în cea mai mare parte de conținutul triptofanului din hrană și de eficiența conversiei acestuia în acid nicotinic, în prezența vitaminelor B_1, B_2, B_5 și A a căror lipsă reduce procentul de formare a acidului nicotinic.

Aportul zilnic de acid nicotinic este în funcție de numărul de calorii consumate La adulți se recomandă 17 mg/zi la o hrană care dă prin metabolizare 1800 Kcalorii și 21 mg/zi dacă alimentele consumate vor da 3200 calorii, cu o medie de 5,4 mg/1 000 kcalorii.

Adolescenții au nevoie zilnic de 17—25 mg de acid nicotinic. În cursul sarcinii și a lactației necesitățile zilnice cresc cu 3 și respectiv 7 mg/zi, în comparație cu aportul zilnic pentru adulți.

Necesitățile în nicotinamidă cresc în perioada sarcinii, a lactației, cancer, la utilizarea orală a contraceptivelor și la oamenii cu deficiențe proteice.

11.8. ROL ȘI ACȚIUNE BIOCHIMICĂ

Vitamina PP, prin formele sale coenzimatice (NAD, NADP), are un rol esențial în organism în producerea energiei, prin metabolizarea glucidelor, lipidelor, protidelor și a altor compuși. Ea are de asemenea un rol însemnat în procesele de creștere și în biosinteza hormonilor.

Structura moleculară a coenzimelor nicotinamidadenindinucleotid (NAD^+) și a nicotinamidadenindinucleotidfosfat ($NADP^+$) se prezintă în figura 11.10.

Coenzimele piridinice au un rol deosebit de important în oxidările celulare și în energogeneză. Ele intră în constituția unor enzime denumite generic *dehidrogenaze* sau *transhidrogenaze*, care transportă hidrogenul de pe un substrat pe altul predominant în interiorul celulelor. Coenzimele piridinice sunt capabile să primească hidrogen și elec-

Scanned with OKEN Scanner

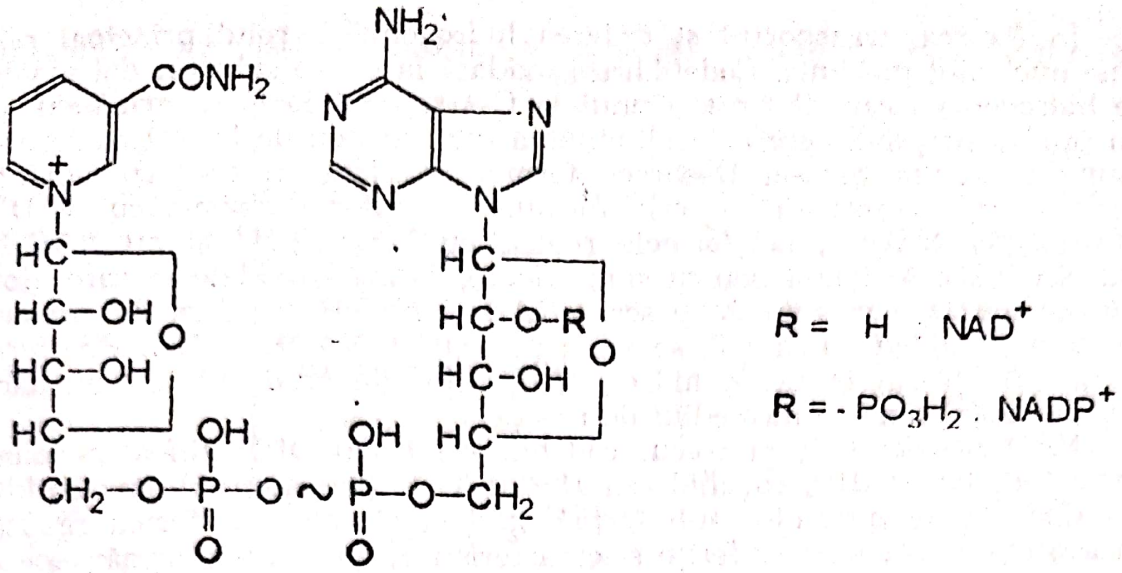


Fig. 11.10. Structura moleculară a coenzimelor NAD^+ și $NADP^+$.

troni, să-i transfere în mod reversibil de la donator la acceptor și să cedeze hidrogen și electroni.

Dehidrogenazele cu coenzime piridinnucleotidice se numesc dehidrogenaze anaerobe, deoarece acceptorul de hidrogen transferat de ele nu este oxigenul, ci alt compus, de preferință coenzimele flavinice (FMN, FAD). Dehidrogenazele piridinice se găsesc în toate celulele vegetale și animale, contribuind la înfăptuirea a numeroase reacții de oxidoreducere, inclusiv în procesul de respirație și de oxidare fosforolitică, sursele principale de energie din organism.

NAD și NADP sunt coenzime piridinnucleotidice fiind formate din nicotinamidă, două molecule de riboză, acid pirofosforic și adenină. NADP-ul are în plus față de NAD un rest de acid fosforic de C-2 al ribozei legată de adenină. Ambele coenzime se pot prezenta sub două forme: o formă oxidată și o formă redusă (fig. 11.11). Prin trecerea reversibilă a formei oxidate în forma redusă, se realizează transportul hidrogenilor și al electronilor. Mecanismul de acțiune al acestor coenzime se prezintă în figura 11.11.

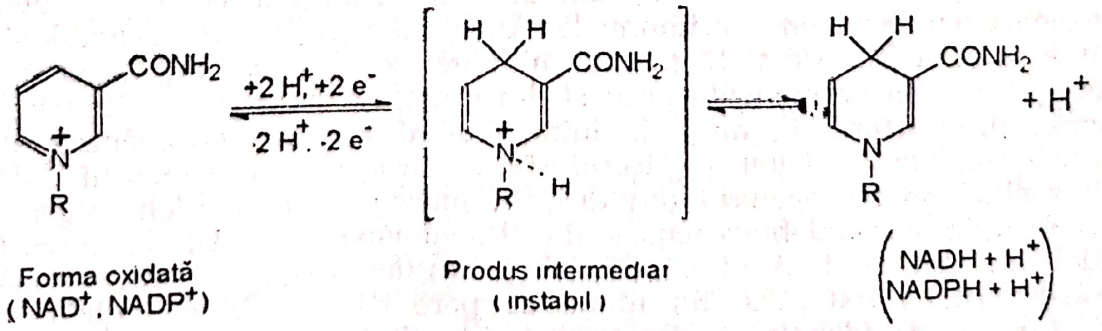


Fig. 11.11. Formele oxidate și reduse ale coenzimelor

Scanned with OKEN Scanner

În fixarea, transportul și cedarea hidrogenului, rolul principal revine nucleului piridinic. Codehidraza oxidată ia de pe substrat doi atomi de hidrogen pe care îi fixează unul la C-4 și unul la N-1, formându-se un produs nestabil, care prin eliminarea unui proton de la N-1 se transformă în forma redusă. Deoarece formele oxidate au azot cu sarcină pozitivă, este corect să se scrie formulele acestor coenzime cu NAD^+ și respectiv $NADP^+$, iar formele reduse cu $NADH+H^+$ și nu $NADH_2$ sau $NADPH_2$. Mai nou pentru simplificare, formele oxidate la care atomul de azot are valența 5, se scriu NAD și NADP, iar formele reduse, ce conțin azot cu valența 3, se scriu prescurtat NADH și NADPH, fără să mai fie trecut ionul de hidrogen, desprins de produsul intermediar, care de altfel rămâne în mediul de reacție.

NAD s-a denumit în trecut codehidraza I sau DPN (difosfopiridinnucleotid), iar NADP, codehidraza II sau TPN (trifosfopiridinnucleotid).

Coenzimele piridinice sub formă oxidată și cele sub formă redusă au aspecte de absorbție diferite și caracteristice, putându-se urmări spectrofotometric transformarea lor reciprocă. NAD în prezența ATP și a unei NAD--pirofosforilaze se transformă în NADP, iar acesta sub acțiunea unei fosfataze și a ADP-ului se transformă în NAD, reacția fiind reversibilă.

$$NAD + ATP \xrightarrow[\text{Fosfatază}]{\text{NAD-pirofosforilaze}} NADP^+ + ADP$$

Pe baza mai multor cercetări (MAAYAN și colab., 1968; STREGFER și colab., 1971) s-a arătat că NAD^+ și NADPH pot fi convertiți în mod reciproc unul în altul în organism de o transfosfatază. Aceste coenzime se pot interschimba sub forma oxidată sau redusă și sub acțiunea unei transhidrogenaze.

$$NADPH + NAD \rightleftharpoons NADP + NADH$$

Dehidrogenazele cu coenzime piridinnucleotidice catalizează reacții de transformare a alcoolilor în aldehide, cetone și acizi, a acidului lactic în acid piruvic, a glicerolului în dihidroxiacetonă etc. În tabelul 11.3. sunt trecute principalele dehidrogenaze cu coenzimele lor, substratul asupra căruia acționează și produșii de reacție. În enzime, coenzimele piridinice se leagă relativ slab de partea proteică, putându-se separa ușor prin dializă.

Reacțiile inverse vor conține coenzime reduse (NADH, NADPH). În reacțiile puternic energetice NADPH este mai mult răspândit decât NAD.

În ce privește sursele naturale din care s-au extras diferite dehidrogenaze cu coenzime piridinnucleotidice, se menționează acetaldehiddehidrogenaza din ficat, D-glicerodehidrogenaza din spanac, L-malatdehidrogenaza din germeni de grâu și din mușchiul cardiac, lactatdehidrogenaza din lactobacili, mușchi, inimă, dihidroorotatdehidrogenaza din *Zymobacterium oroticum*, α-glicerofosfatdehidrogenaza din mușchi, 3-P - gliceroaldehiddehidrogenaza din drojdie, mușchi, glutamatdehidrogenaza din ficat, ß-steroiddehidrogenaza din *Pseudomonas*, NADH-citocrom-C-reductaza din ficat și inimă, NADPH-transdehidrogenaza din *Pseudomonas*, NADH-diaforaza din inimă de porc (BEDELEANU, 1985).

L-malicodehidrogenaza din ficat are ca și coenzimă specifică NAD^+ și nu acceptă $NADP^+$. Așa după cum reiese din tabelul 11.3. unele co-

Scanned with OKEN Scanner

Tabelul 11.3

Principalele dehidrogenaze cu coenzimele lor, substratul asupra căruia acționează și produi de reacție

Substrat	Enzimă	Coenzimă	Produs de reacție
Alcool etilic	Alcooldehidrogenază	NAD^+	Aldehidă acetică
Acid lactic	Lacticodehidrogenaza	NAD^+	Acid piruvic
Acid L-malic	L-malicodehidrogenaza	NAD^+	Acid L-malic
3-P-glicerol	3-P-glicerodehidrogenaza	NAD^+	3-P-dihidroxiacetonă
Azotați (HNO_3)	Nitratreductaza	NAD^+	Nitriți (HNO_2)
6-P-glucoză	6-P-glucozodehidrogenaza	$NADP^+$	Acid 6-P-gluconic
Acid izocitric	Izocitricodehidrogenaza	$NADP^+$	Acid oxalilsuccinic
L-malat	Malatdehidrogenaza	$NADP^+$	Acid piruvic + CO_2
Glutation redus	Glutationreductaza	$NADP^+$	Glutation oxidat
Acid glutamic	Glutamicodehidrogenaza	NAD^+	Acid iminoglutamic
Acid hidroxibutiric	Hidroxibutiratdehidrogenaza	NAD^+	Acd cetobutiric
Sorbitol	Sorbitoldehidrogenaza	NAD^+	Glucoză
Acid 6-fosfogluconic	6-P-gluconicodehidrogenaza	$NADP^+$	Acid 3-cetogluconic
5-P-riboză	5-P-ribozodehidrogenaza	$NADP^+$	5-P-δ-riboglucona
Acid dihidroorotic	Dihidroorotaza	$NADP^+$	Acid orotic

enzime piridinice sunt specifice pentru NAD^+, altele pentru $NADP^+$. Unele însă, cum sunt glutamatdehidrogenaza, acceptă ambele coenzime. Reacțiile catalizate de coenzime piridinice sunt în general reversibile.

Întrucât vitamina PP, sub formele sale coenzimatice, participă la transformările biochimice și fiziologice din toate organele, țesuturile și celulele din organismele vegetale și animale, participă cu rol însemnat în metabolismul glucidelor, lipidelor și protidelor, precum și în energogeneză se consideră că dintre toate vitaminele, cea mai mare importanță în metabolismul celular al tuturor celulelor o are vitamina PP.

Vitamina PP așa după cum s-a menționat deja, este un important factor de creștere pentru numeroase microorganisme. Pe lângă funcțiile principale ale coenzimelor piridinnucleotidice de acceptori, transportori și donori de hidrogen, ele îndeplinesc și rolul de acceptori, transportori și donori de electroni care contribuie la activarea citocromilor. Ele au de asemenea un rol însemnat în formarea compușilor fosfomacroergici, în utilizarea oxigenului și în teratogeneză.

11.9. HIPOVITAMINOZE ȘI HIPERVITAMINOZE PP

În carență de acid nicotinic sau de nicotinamidă, apar la om o serie de simptome caracteristice bolii cunoscută sub numele de *pelagră* (piele aspră). În afară de om, numai la câine apar simptome specifice și caracteristice în stare carențială de niacină prin înnegrirea limbii (limbă neagră).

Pelagra este o boală care o fost răspândită în regiunile sudice ale SUA, în Italia, America de Sud, Africa de Sud, regiuni în care populația consumă multă făină de porumb și puțină carne. Ea a fost răspândită și în țara noastră în secolele XV—XVIII. În țările industrializate pelagra este rareori semnalată, fiind determinată de consumul abuziv de alcool.

Scanned with OKEN Scanner

Nicotinamida este un constituent structural al coenzimelor NAD și NADP care se găsesc în toate țesuturile și celulele organismelor, având un rol fundamental în oxidările celulare. În stări de hipovitaminoză PP se produce o scădere a concentrației acestor coenzime, în special în ficat și musculatură, în timp ce conținutul lor în sânge, inimă și rinichi rămâne în domeniul unor modificări normale. Există o bună corelare între intensitatea hipovitaminei și conținutul acidului nicotinic și a nicotinamidei din ficat și mușchi.

Pelagra apare la oamenii care consumă multă făină de porumb (mămăligă), adeseori alterată sau melasă de trestie de zahăr, fiind agravată de alcoolismul cronic. Efectul pelagrogen al porumbului se datorește conținutului redus în triptofan și lizină, care sunt aminoacizi esențiali, din proteinele existente în făina de porumb. Triptofanul se transformă ușor în organism în acid nicotinic, iar un conținut redus de triptofan duce la o deficiență niacinică. Pe de altă parte, triptofanul în boabele de porumb, și probabil și în alte cereale, se găsește sub forma unui complex inactiv „niacitina", care conține pentoze, acizi cinamici, aminofenoli, astfel încât triptofanul este blocat în acest complex, nefiind biodisponibil. Se presupune chiar că bobul de porumb conține un inhibitor (antivitamină) al conversiunii triptofanului în acid nicotinic.

Pelagra este o boală determinată de o alimentare necorespunzătoare, săracă în proteine și aminoacizi esențiali, în special în triptofan. Ea nu este o niacinvitaminoză pură deoarece la apariția ei contribuie și alte deficiențe vitaminice B (B_1, B_2, B_6). Pelagra este frecvent însoțită de infecții acute sau cronice, care la rândul lor pot accentua crizele pelagroase. Majoritatea bolnavilor de pelagră prezintă și anemie de tip macrocitar, hipocromă și aclorhidrie histaminorezistentă. Simptomele pelagrei depind de severitatea și durata stării carențiale. Simptomele precoce sunt nespecifice, caracterizate prin astenie, indigestie, ulterior apariția stomatitelor, umflarea și înroșirea limbii, scăderea în greutate, anorexie, insomnie etc.

În stare carențială avansată, boala este cunoscută sub numele de „boala celor trei D": dermatită, diaree, demență, a căror apariție poate determina un diagnostic precis. Pot apărea și polinevrite precum și o anemie datorită unei deficiențe de tiamină și fier.

Tulburările dermice sunt leziuni cutanante tipice, care apar sub formă de eriteme, care se dezvoltă în general bilateral și simultan. Ele apar predominant pe părțile corpului expuse la soare: fața dorsală a mâinilor („mănușile" pelagrosului), partea dorsală a picioarelor și gleznelor („cizmele" pelagrosului), pe față, nas, bărbie, pe frunte (eritem „în fluture"), la gât și pe stern („cravata" pelagrosului sau a lui Cassal). Expunerea la lumină sporește gravitatea leziunilor. Leziunile dermice încep cu apariția unor pete roșii (eritem), cu dureri la locul apariției acestora, formarea de pustule cu lichid galben, care după spargere și uscare, formează o piele groasă, aspră (pella-agra) de culoare roșie, care se închide la culoare și devine brună castanie, caracteristică. Dacă fenoemnele dermice se cronicizează se formează o piele uscată, aspră și pigmentată, cu fisuri și crăpături. Aceste simptome dermice nu sunt obligatorii și nu reflectă întotdeauna o gravitate accentuată a bolii. Există și forme de „pelagră fără pelagra", fără manifestări dermice, care

Scanned with OKEN Scanner

sunt mai grave decât cele cu leziuni dermice. Aceste forme apar mai des la copii, dar s-au semnalat și la unii adulți.

Tulburările digestive, care pot apare primele, se caracterizează prin apariția de leziuni la nivelul buzelor, se înroșește mucoasa bucală, apar senzații de arsuri, se produce o hipersalivație. Limba se umflă, devine roșie violacee și dureroasă (glosită). La stomac apar gastrite cu arsuri, balonări, hipoclorhidrie. Apar de asemenea tulburări intestinale, diaree accentuată (până la 50 de scaune pe zi), rezistență la antidiareice, rectite etc. Se înregistrează dereglări puternice în absorbția alimentelor și a celorlalte vitamine, fapt ce determină apariția sindromului policarențial.

Tulburările neuropsihice se manifestă la început prin oboseală, vârtej în urechi, scăderea atenției și a memoriei, apoi apar stări de iritabilitate, alternând cu stări de melancolie, iar în final demența („nebunia pelagrosului"), caracterizată prin depresii melancolice, confuzii mintale, psihoze, fobii, halucinații, care dacă se mențin o perioadă mai îndelungată duc la sinucideri (BEDELEANU, 1985).

Simptomele celor „3D" sunt însoțite de porfirinurie, în special coproporfirinică, scăderea rezistenței la infecții și la agenții toxici. Se reduce excreția N-1-metil-nicotinamidei și a N-1-metil-6-piridon-3-carboxilamida.

Pe lângă pelagra „clasică" descrisă, apar și alte forme clinice ale bolii, mai ales la sugari, cu tulburări digestive, anemie, încetarea creșterii, fără sindromul cutanat. Forme speciale pot să apară și la femei în perioadele de graviditate și alăptare.

Tratamentele cu niacină sau niacinamidă, însoțite de o alimentație bogată în carne, ouă și lapte, atenuează în 3—5 zile fenomenele și leziunile caracteristice, care încep să dispară treptat, după 2—3 săptămâni de tratament. Doza terapeutică se recomandă a fi de 50—500 mg/zi, în funcție de gravitatea bolii. Nicotinamida nu este toxică nici în doze de 1 000 de ori mai mari decât doza terapeutică. În unele cazuri, tratamentul cu nicotinamidă, chiar în doze de 1 g/zi, nu dă rezultate bune dacă nu este schimbat regimul alimentar care să conțină proteine cu conținut mai ridicat de triptofan. Simptome ale pelagrei apar și în alcoolism cronic, ciroze hepatice, diabet, boli febrile etc. boli în care se înregistrează capacitatea scăzută de transformare a triptofanului în acid nicotinic.

La unele populații 8 mg/zi de acid nicotinic sunt suficiente pentru prevenirea pelagrei, dar la altele chiar la o doză zilnică de 15—20 mg, apar simptomele pelagrei, datorită existenței probabile în alimente a unor antivitamine naturale care inhibă transformarea triptofanului în acid nicotinic, sau datorită unei carențe proteice cu conținut foarte redus de triptofan, fapt pentru care pelagra este asimilată cu o „deficiență proteică".

Noile cercetări arată că nicotinamida protejează coenzimele piridinnucleotidice (NAD, NADP) față de acțiunea unor hidrolaze din sânge, creier, plămâni, rinichi, ficat etc., enunțând ipoteza că pelagra s-ar datora dereglării activității enzimelor cu coenzine piridinice. În carență vitaminică PP are loc o dereglare enzimatică și mai puternică a coenzimelor piridinnucleotidice datorită insuficienței nicotinamidei. Această dereglare este ireversibilă în ce privește formarea coenzimelor NAD și NADP și a apoenzimei, datorită deficienței aminoacizilor esențiali, în

Scanned with OKEN Scanner

special a triptofanului, implicat în biosinteza endogenă a acidului nicotinic și indirect a NAD și NADP.

Pelagra este boala care survine în urma instalării stării carențiale a nicotinamidei cu a triptofanului din proteinele alimentare.

Apariția pelagrei la vite, porci, păsări, iepuri etc., determină o scădere a productivității lor, ceea ce a determinat pe crescători să suplimenteze hrana animalelor cu vitamina PP și cu concentrate de vitamine B.

Hipervitaminoze nu s-au semnalat la om și nici la animale, pe baza unui consum echilibrat în alimente și furaje. Cercetările efectuate cu numeroase animale de experiență au arătat că toxicitatea acidului nicotinic și a nicotinamidei este minimă. Iepurii și câinii tolerează doze mari de acid nicotinic și de nicotinamidă administrate oral, perioade îndelungate, până la 2 g/kg corp, fără efecte toxice. Toleranța șoarecelui este mai scăzută în deficiență de riboflavină. Nicotinamida, prezintă toxicitate acută (DL_{50}) la doze orale de 3 180 mg/kg corp la șoarece și de 1 700—4 100 mg/kg corp la șobolan. Doza letală la șoarece dată intravenos este de 3 150 mg/kg corp. Toxicitatea subcronică apare la șoarece tot la 3 180 mg/kg corp doză dată oral și 3 150 mg dată intravenos, timp de 10 zile. La șobolan doza orală este de 3 760 mg/kg corp.

La oamenii voluntari, care au acceptat administrarea unor hiperdoze de nicotinamidă, se remarcă o dereglare a proceselor de metilare, apariția unor tulburări respiratorii, ale glandelor endocrine, digestive și nervoase. Acidul nicotinic, dar nu și nicotinamida, produce vasodilatație periferică, stimularea secreției gastrice, prurit, inhibarea biosintezei colesterolului.

Nu există teste clinice bine definite care să caracterizeze precoce deficiența în acid nicotinic. Simptomele caracteristice apar după instalarea mai îndelungată a stării de carență. Un simptom clinic este excreția porfirinelor în urină (coproporfirinurie). O altă probă constă în „testul de saturare", care constă în administrarea unei doze de acid nicotinic la un pacient și măsurarea ulterioară din urină a compușilor săi de metabolizare. Un om sănătos elimină prin urină 110 mg de metaboliți din 500 mg de niacină administrată.

11.10. INTERRELAȚII VITAMINICE

Pe cale experimentală s-a stabilit că tratamentul îndelungat, cu doze mari de vitamina B_1 și respectiv C, determină apariția sindromului pelagros. De asemenea, s-a remarcat că în stările de carență B_1 și B_6, separat sau concomitent, scade în mod accentuat conținutul nicotinamidei din ficatul de șobolan. În stări de avitaminoză biotinică se dereglează activitatea enzimelor cu coenzime piridinnucleotidice și se modifică raportul dintre conținutul NAD/NADP, conținutul total a vitaminei PP rămânând relativ constant, nemodificat în mod semnificativ.

Carența în vitamina PP duce la o scădere a conținutului vitaminelor B_1, B_2 și B_6, cu care nicotinamida are o acțiune sinergică în multe procese metabolice. Vitamina PP are o acțiune sinergică și cu acizii folici în procesele de creștere și în tratamentul pelagrei (TERROINE, 1966).

Scanned with OKEN Scanner

11.11. ANTIVITAMINE

Structura principalilor compuşi cu acţiune antivitaminică PP se prezintă în figura 11.5. Pe lângă aceştia, acţiune antivitaminică are hidrazida izonicotinică (fig. 11.3).

Experimental s-a dovedit că acidul ß-piridinsulfonic inhibă creşterea şobolanilor ţinuţi la un regim sărac în proteine, iar administrarea în hrană de acid nicotinic suprimă efectul inhibitor.

Sulfamidele de asemenea se comportă ca antimetaboliţi faţă de vitamina PP, transformând acidul nicotinic în acid piridin-3-sulfonic sau în amida sa Adenina, adăugată în hrana câinilor şi a şobolanilor, determină apariţia simptomelor pelagroase în aproximativ 20 de zile. 3-Acetilpiridina este un compus toxic cu acţiune antivitaminică, care provoacă dereglări accentuate la nivelul sistemului nervos central la şoareci şi şobolani. Apar leziuni primare la nivelul nucleului supraoptic şi a hipotalamusului. Acetilpiridina şi 6-aminonicotinamida determină apariţia de malformaţii la puii de găină, care pot fi vindecate dacă nicotinamida este injectată câteva ore la şoareci şi la bacterii. Deficienţa în cupru a organismului are ca repercusiuni inhibarea conversiunii triptofanului în niacină. Experimental s-a demonstrat eă medicamentele antibiotice, în special penicilinele inhibă la om transformarea triptofanului în acid nicotinic. Rifamicina şi isoniazida, medicamente pentru combaterea tuberculozei, inhibă absorbţia vitaminei PP.

11.12. INDICAŢII TERAPEUTICE ŞI PRODUSE FARMACEUTICE

Preparatele farmaceutice cu nicotinamidă se recomandă în eritemul solar şi după iradiere cu raze X, în dermatite alimentare şi toxice, în herpes, zona Zoster, în enterocolite, hepatite, în psihoze senile, în intoxicaţii cu plumb şi barbiturice, practic în toate manifestările pelagrei.

Acidul nicotinic nu se utilizează în clinică pentru efectul vitaminic deoarece prezintă efecte vasodilatatoare şi supra încălzirea pielii. Este utilizat pentru stimularea reacţiilor de oxidoreducere în metabolismul glucidelor, lipidelor, protidelor şi de inhibare a acizilor graşi şi a colesterolului. Se utilizează şi în tulburările circulatorii periferice, în astm şi anghină pectorală.

Dermatitele acute pot fi tratate dacă zilnic se administrează la adult între 50 şi 500 mg de acid nicotinic, în funcţie de gravitatea bolii. Pentru formele cronice de pelagră se administrează 160—500 mg/zi. Doze mai mari de 500 mg se folosesc pentru vindecarea diareei, iar doze foarte mari se dau în tratamentul nevritelor şi tulburărilor neuropsihologice grave (demenţă).

Dozele mari de acid nicotinic se folosesc pentru reducerea nivelului colesterolului din ser, a conţinutului acizilor graşi şi a lipidelor totale. La voluntarii sănătoşi, 1 g de acid nicotinic dat de trei ori pe zi, timp de o lună, micşorează conţinutul colesterolului cu 15% şi al trigliceridelor cu 27%.

Scanned with OKEN Scanner

Acidul nicotinic se administrează în doze de 100 mg ca un bun vasodilatator și se dă pacienților suferinzi de boli provocate de vasoconstricție. Este utilizat de asemenea în tratamentul glositelor, dermatitelor alimentare și simptomelor neuropsihice care apar în pelagră. Pentru prevenirea pelagrei se recomandă utilizarea a 6,6 niacin echivalenți (NE) la 1 000 Kcal și nu mai puțin de 13 NE pentru 2 000 Kcal la adultul de toate vârstele. La femei în perioada sarcinii necesarul de NE poate crește cu 2, iar în perioada lactației cu 3 NE/zi. La sugari se recomandă utilizarea a 8 NE/1 000 Kcal, timp de 6 luni.

Preparatele farmaceutice cu vitamină PP se dau sub formă de tablete, capsule și sirop. Multe preparate cu polivitamine conțin și vitamina PP.

Acidul nicotinic se găsește sub formă de nicotinat de sodiu în fiole, cu concentrații de 5 sau 10%, conținând 50 sau 100 mg pe fiolă.

Tabletele sunt dozate în general la 100 mg de nicotinamidă pe tabletă. Pentru tratamentul pelagrei se folosește administrarea pe cale orală, iar pentru producerea unor efecte vasodilatatoare rapide se folosește calea intravenoasă (60—100 mg). Este recomandabil să nu se folosească mai mult de 1 000 mg pe zi, date fracționat, chiar și în cazurile mai grave de pelagră. Dozele terapeutice variază frecvent între 300 și 1 000 mg/zi. În preparatele multienzimatice este frecvent utilizată nicotinamida și nu acidul nicotinic. Dozele mai mari de 300 mg acid nicotinic, dar nu și de nicotinamidă, se dau în tratarea glositelor, a diareei și a unor dureri acute. Doze de 2,5 g/zi se dau în toxicitate hepatică, intoleranță la glucoză, hiperglicemie, creșterea acidului uric în sânge, infarct, grețuri, dereglări optice etc. Unele afecțiuni ca icterul epidemic, tratate cu 700 mg acid nicotinic/zi ar putea să ducă la dereglări ireversibile ale ficatului.

Dozele mari de acid nicotinic determină o scădere a conținutului excedentar de histamină din celule. Histamina stimulează activitatea mușchilor viscerali, dilatarea capilarelor, stimulează salivația, secreția sucului gastric și a celui pancreatic.

În țările industrializate, niacina se adaugă în diferite preparate alimentare de origine vegetală (pâine, produse de patiserie, macaroane, spagheti, gris, făinuri etc.) pentru ridicarea valorii lor biologice și a preveni apariția hipovitaminozei PP.

Dintre preparatele multienzimatice face parte și *Protovitul*, produs de firma Hoffman La Roche, care se aplică sub formă de picături (15 ml), drajeuri (40, 120 mg) și capsule (20, 60 mg).

Nicotinamida este frecvent utilizată în asociere cu alte vitamine din complexul B pentru tratamentul pelagrei și în general a bolilor dermatologice și a mucoaselor epiteliale. Este de asemenea folosită în tratamentul intoxicațiilor cu plumb, arseniu și în cele alcoolice. Ca vasodilatator este folosită în tratamentul astmei, anghinei pectorale, migrenelor, dereglări circulatorii și chiar a schizofreniei. Există indicii că nicotinamida leagă trei grupe metil produse în metabolism și astfel reduce conținutul compușilor cu acțiune psihomimetică. La schizofrenici concentrația N-1-metil-nicotinamidei este de 5 la 8 ori mai mare în sânge decât limita normală. De asemenea, se produce o creștere a eliminării nicotinamidei din sânge în comparație cu cea găsită la oamenii sănătoși.

Scanned with OKEN Scanner

Capitolul 12. ACIZI FOLICI SAU PTEROILGLUTAMICI

12.1. Scurt istoric 302
12.2. Structura compușilor folici și folinici 303
12.2.1. Structura compușilor folici 303
12.2.2. Structura compușilor folinici 308
12.2.3. Analogi pteridinici activi 308
12.3. Extragere, sinteză și biosinteză 310
12.4 Proprietăți fizice și chimice 312
12.5. Metode de identificare și dozare 313
12.6. Răspândire în natură 313
12.7. Absorbție, excreție și necesități 314
12.8. Rol și activitate biochimică 316
12.9. Hipovitaminoze și hipervitaminoze 321
12.10. Interrelații vitaminice 323
12.11. Antivitamine 324
12.12. Indicații terapeutice și substanțe farmaceutice 328

Grupul generic al „*acizilor folici*“ este constituit dintr-un complex de vitamine B, care din punct de vedere chimic sunt corelate cu acidul pteroilglutamic, au acțiune hematopoietică și leucopoietică, dar se deosebesc între ele prin acțiunea specifică pe care o au asupra diferitelor microorganisme și specii de animale.

Aparțin acestui grup acidul folic, acidul folinic, acidul tetrahidrofolic, acidul dihidrofolic, vitamina Bc-conjugată, vitaminele M, U, R etc.

Acidul folinic se mai numește și „citrovorum factor“ deoarece este indispensabil culturilor de *Leuconostoc citrovorum*. Vitamina M este un factor nutritiv care vindecă anemia nutrițională la maimuță, de unde îi derivă și numele. Vitamina Bc-conjugată vindecă anemia macrocitară a puilor de găină și este esențială pentru creșterea microorganismelor *Lactobacillus casei* L. și *Streptococcus faecalis* R.

Dintre alți factori nutriționali corelați cu grupa acidului folic menționați de diferiți cercetători fac parte factorul U, factorul R, factorul S, vitaminele B_{10} și B_{11} etc., factori necesari creșterii unor microorga-

nisme sau vindecării unor forme diferite de anemie la animale. Toți acești factori se pot obține prin extracte apoase din drojdii, frunze de spanac, ficat etc., prin adsorbție pe cărbune activ (norit) și apoi eluate de pe adsorbant cu diferiți compuși. Prin metode fizice și chimice compușii din complex pot fi separați, identificați și dozați. Acizii folici au un rol însemnat în formarea globulelor roșii și albe din sânge, în prevenirea și tratarea anemiilor, sunt factori de creștere pentru numeroase organisme, au un rol fundamental în activarea și transportul unităților C_1 active (-CH_3, -CH_2OH, -C=O, HCOO-, -CH=NH etc.), în biosinteza bazelor azotate, a acizilor nucleici și a proteinelor, în metabolismul unor aminoacizi etc.

12.1. SCURT ISTORIC

Primele observații cu privire la existența unui nou factor alimentar, cu acțiune vitaminică, s-au semnalat în perioada anilor 1931—1932, când s-a constatat că leucopenia și granulocitopenia maimuțelor poate fi vindecată cu ajutorul unui extract obținut din drojdia de bere.

În 1931, *L. Wills* și *B. S. Lond* extrag din drojdia de bere un factor antianemic activ pe maimuță, numit vitamina M (M = monky). Tot în 1931, *L. Wills*, aflat în India, remarcă efectul favorabil al unui extract din ficat și drojdii asupra anemiei macrocitare tropicale, concluzionând că această afecțiune trebuie să fie cauzată de lipsa unui factor nutritiv, unei deficiențe alimentare. În 1938, *P. Day, W. C. Langeston, W. Y. Darby* constată că extractul din drojdia de bere este activ și asupra puilor de găină, stimulând creșterea acestora. A fost numit factor de creștere pentru pui sau „Factor U". *A. G. Hogan* și *E. M. Parrott* reușesc să descopere în extractele din ficat un factor antianemic pentru puii de găină, căruia îi dau numele de „Vitamina Bc" (c = chick, pui de găină).

În perioada 1939—1940, *E. E. Snell* și *W. H. Peterson* obțin din ficat un factor de creștere pentru *Lactobacillus casei*, izolat prin adsorbție pe cărbune activ (norit) și eluare cu alcool anomiacal și îl denumesc „factor *L. Casei*" sau „norit--eluat-factor".

În 1941, *H. K. Mitchell, E. E. Snell, R. J. Williams* reușesc să izoleze din frunzele de spanac acidul folic (folium = frunză), care stimulează creșterea la *Streptococcus lactis* și manifestă proprietăți vitaminice la animale. Ulterior s-a constatat că factorii nutritivi obținuți de diferiți cercetători din drojdie, ficat, spanac, microorganisme, fac parte din aceeași grupă și s-a propus denumirea lor generică de *acizi folici*.

Scanned with OKEN Scanner

Termenul de folați este utilizat să desemneze toți membrii familiei acizilor folici și a derivaților acestora, inclusiv compușii în care acidul folic este legat de una sau mai multe resturi de molecule de acid L-glutamic.

Stabilirea structurii chimice a acidului folic a fost efectuată de *E. L. Wittle, B. L. O'Dell, J. M. Vandenbelt, J. J. Pfiffner*, în 1945, confirmată în același an prin sinteza de *R. B. Angir* și colab., care menționează că în componența acidului folic intră și unii pigmenți pteridinici izolați anterior din aripile fluturilor precum și acidul p-aminobenzoic.

În 1962, *C. Herbert* consumă mai multe luni o dietă deficitară în folați și stabilește simptomele care apar în starea carențială. Totodată stabilește necesitățile în folați pentru oamenii adulți.

Ulterior au fost identificați, în 1973 de către *W. S. Osborne-White* și *R. M. Smith* numeroși factori nutritivi înrudiți (aproximativ 28) din ficatul de cal și șobolan, dintre care o importanță deosebită prezintă acizii folinici implicați în reacțiile de transformilare.

În 1991, *G. Wald* stabilește efectul favorabil al acidului folic în tratarea unor afecțiuni neuropsihice. În 1992, *Butterworth* raportează că dozele mari de acid folic ajunse în sânge reduce riscul apariției cancerului cervical la femei infectate cu „papillomavirusul" uman.

În 1993 Serviciul de Sănătate Publică din S.U.A. hotărăște ca toate femeile să consume zilnic 0,4 mg de folați pentru a reduce riscul apariției unor malformații și afecțiuni cancerigene.

12.2. STRUCTURA COMPUȘILOR FOLICI ȘI FOLINICI

12.2.1. STRUCTURA COMPUȘILOR FOLICI

Acidul folic se numește astfel deoarece a fost izolat prima dată din frunzele plantelor (folium — frunză). Se mai numește și acid pteroilglutamic, denumire ce provine din structura sa chimică. Este identic cu vitaminele Bc, B_4, M, U, R, *Lactobacillus* factor, precum și cu cea de Norit eluat factor, pentru că la izolarea sa din produsele naturale se folosește adsorbția pe cărbune Norit (cărbune activ) și eluare cu soluții amoniacale.

Acidul folic este un factor de creștere pentru șobolani și puii de găină. La om vindecă anemia nutrițională și în asociere cu vitamina B_{12} și anemia pernicioasă.

Scanned with OKEN Scanner

Structura moleculară a acidului folic se prezintă în figura 12.1.

Structura chimică a acidului folic s-a stabilit inițial prin identificarea compușilor ce rezultă din degradarea sa hidrolitică, în mediu alcalin aerob. În aceste condiții din acidul folic s-a obținut o fracțiune cu funcție aminică aromatică primară, din care prin hidroliză ulterioară se eliberează *acidul paraaminobenzoic* și *acidul glutamic.*

A doua fracțiune avea structură pteridinică, era fluorescentă și prezenta caracter acid.

Acidul folic are o structură complexă, fiind format dintr-un nucleu pteridinic, o moleculă de acid p-aminobenzoic și una de acid glutamic. Legătura dintre nucleul pteridinic (pterină) și acidul p-aminobenzoic se realizează printr-o punte metilenică, iar legătura dintre acizii p-aminobenzoic și glutamic se face printr-o legătură peptidică. Structura pteridinei și a pterinei se prezintă în figura 12.2.

Pteridina are o structură biciclică fiind formată dintr-un nucleu pirimidinic (A) și unul pirarzinic (B). Ea contribuie la formarea pterinei (2-amino-4-hidroxi-6-metil-pteridina), care împreună cu acidul p-aminobenzoic formează *acidul pteroic* (Pte), iar prin atașarea unui rest

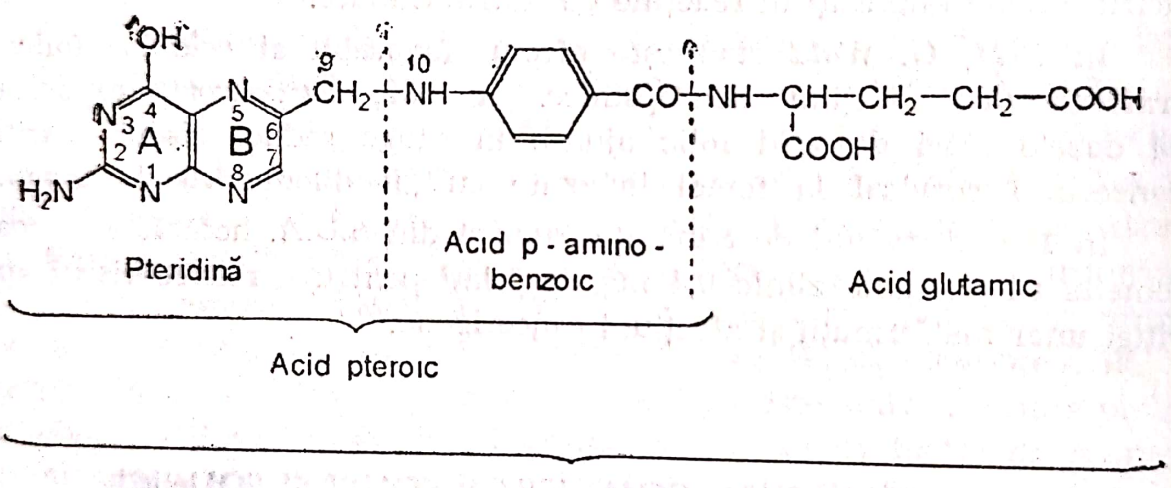


Fig. 12.1. Structura moleculară a acidului folic

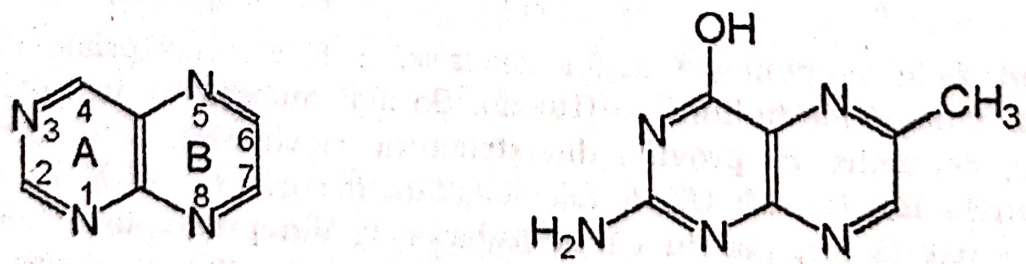
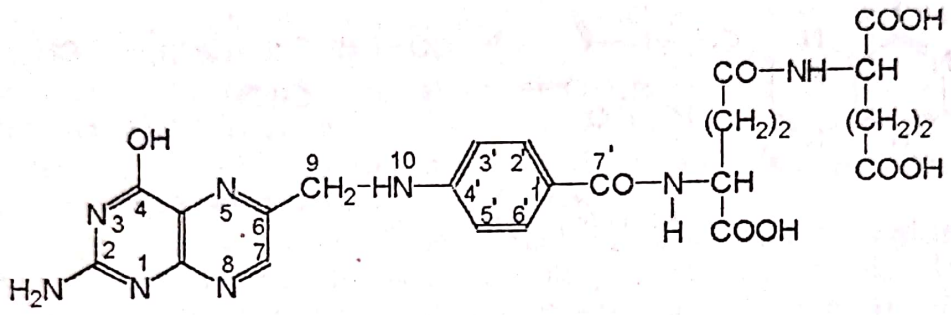


Fig. 12.2. Structura pteridinei și a pterinei

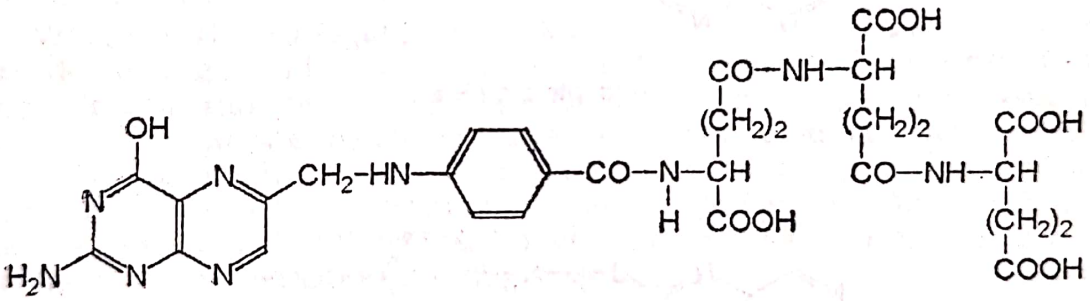
Scanned with OKEN Scanner

de acid glutamic (Glu) se obține acidul pteroilmonoglutamic (Pte-Glu), respectiv acidul folic. Prin atașarea unor noi resturi de acid glutamic la acidul folic prin legături γ, se pot obține *diopterina* ($Pte\text{-}Glu_2$), *teropterina* ($Pte\text{-}Glu_3$), *vitamina Bc conjugată* ($Pte\text{-}Glu_7$). Se cunosc și alți derivați, cum sunt acizii N-10-metil-, N-10-formil-folici, rhizopterina (acidul N-10-metil-pteroic), factorul SLR (acid N-10-formil-pteroic), acidul pteroic etc. Structura acestor compuși se prezintă în figura 12.3.

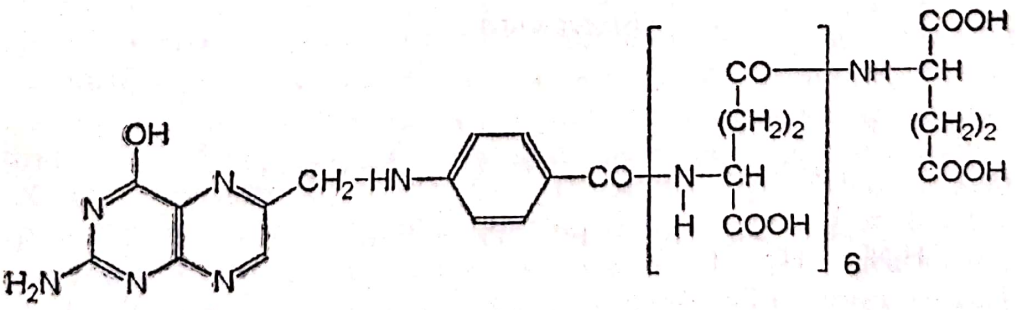
Pteridele formează pigmenții din aripile fluturilor. Ele au fost identificate de *F. G. Hopkins* în 1889 pe baza fluorescenței intense



Diopterină ($Pte\text{-}Glu_2$)



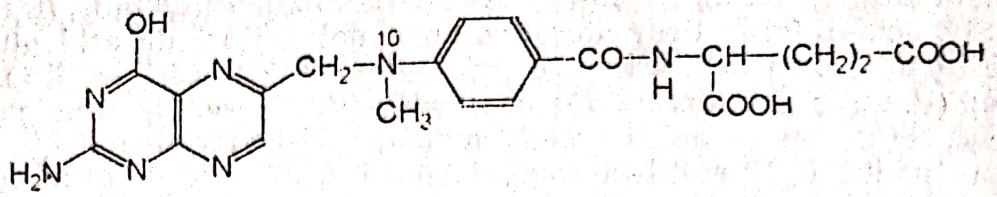
Teropterină ($Pte\text{-}Glu_3$)



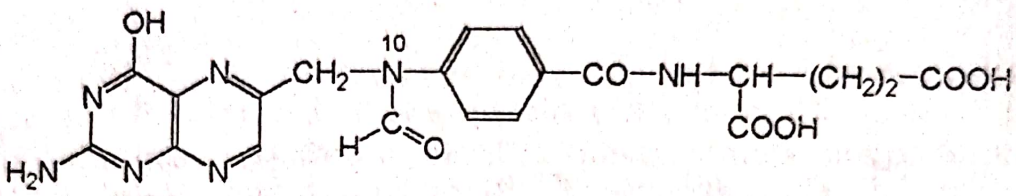
Vitamina Bc - conjugată ($Pte\text{-}Glu_7$)

Fig. 12.3. Structura unor compuși pteroidici și folici

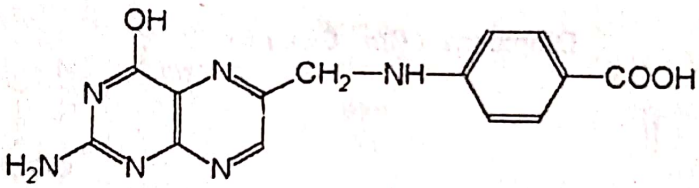
Scanned with OKEN Scanner



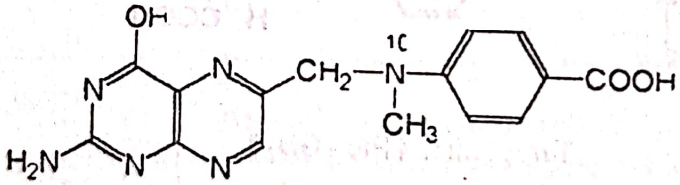
Acidul - N_{10} - metil - folic



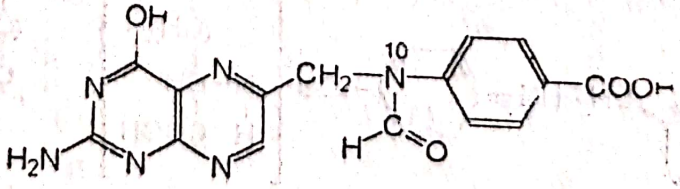
Acid - N_{10} - formil - folic



Acid pteroic (Pte)



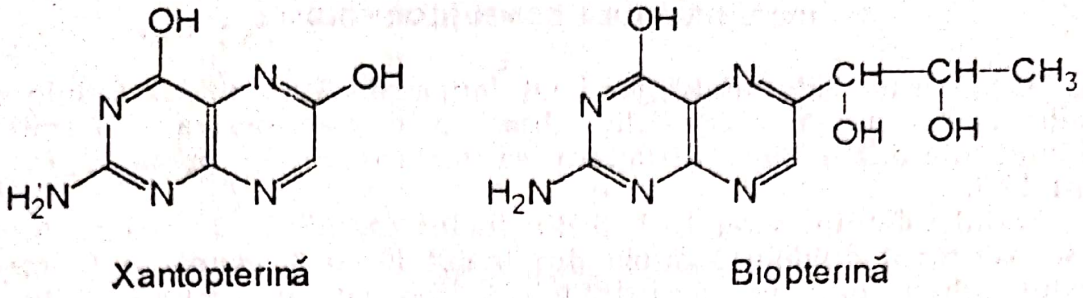
Acid - N_{10} - metil - pteroic
(Rhizopterină)



Acid - N_{10} - formil - pteroic
(Factor SLR)

Fig. 12.3. Structura unor compuşi pteroidici şi folici

Scanned with OKEN Scanner



Xantopterină Biopterină

Fig. 12.4. Structura xantopterinei și a biopterinei

în UV. Ulterior s-au descoperit mai multe pteridine (xantopteridina, leucopterina, izoxantopterina) la animale și microorganisme, descoperindu-se rolul lor (*H. Wieland,* 1925) de cofactori ai hidroxilazelor, ca precursori ai vitaminei B_{12} și ca elemente structurale ai acizilor folici și folinici (KORTE și GOTO, 1977 (fig. 12.4).

Acidul pteroic nu prezintă activitate anemică și nici nu stimulează creșterea speciei *Lactobacillus casei.*

Diopterina se găsește sub formă de acid pteroil-L-glutamil-α-glutamic și sub formă de acid pteroil-γ-glutamil-glutamic. Primul acid este eficace în tratarea anemiei macrocitare la om și atenuează la cancerоși simptomele dureroase.

Teropterina sau acidul pteroilglutamic se mai numește și „Factor *L. casei*", care îi definește activitatea de factor de creștere. Este utilizat în tratamentul tumorilor maligne.

Vitamina Bc conjugată sau acidul pteroilhexaglutamic are 7 resturi de acid glutamic substutite la acidul pteroic. Reprezintă forma predominantă sub care se găsește acidul folic în țesuturi. Vitamina Bc conjugată nu are o acțiune directă asupra anemiei macrocitare la om și nici nu stimulează creșterea la *L. casei* și *Streptococcus lactis* R (SLR). Prezintă acțiune curativă în anemia puilor de găină. Sub acțiunea unei enzime hepatice numită vitamina-Bc-conjugaza, vitamina Bc conjugată eliberează acidul pteroilglutamic activ.

Vitamina Bc conjugată este forma cea mai răspîndită sub care se găsește acidul folic în alimentele naturale. Ea este eficientă în tratarea anemiei macrocitare și la maimuță. Enzima vitamin-Bc-conjugaza are acțiune carboxipeptidazică. A fost inițial izolată din ficat, iar ulterior și din rinichi de porc, pancreas (pui de găină), de la gâște și din materiale vegetale (cartofi, migdale). Microorganismele nu conțin această enzimă și de aceea nu pot utiliza vitamina Bc conjugată.

Acidul N-10-formil-pteroilglutamic (acid rizopteringlutamic) a fost obținut din diferite produse biologice. Are substituit un radical formil la N-10 al acidului folic. Este de 10 ori mai activ decât acidul folic asupra creșterii microorganismelor *L. casei* și *Str. faecalis* R.

Rizopterina este un factor de creștere pentru *Streptococcus faecalis* R (SLR) dar nu are acțiune la *Lactobacillus casei* și nici asupra anemiei puilor de găină. Este un derivat al acidului pteroic. S-a obținut prin sinteză din acid pteroic și acid formic. S-a izolat din lichidul de fermentare de la *Rhizopus nigricans.*

Scanned with OKEN Scanner

12.2.2. STRUCTURA COMPUȘILOR FOLINICI

Dintre compușii folinici ,cel mai important este acidul folinic sau acidul N-5-formil-tetrahidrofolic. Acest acid este derivatul formil al acidului pteroilglutamic. Structura sa moleculară se prezintă în figura 12.5.

Acidul folic are fixat la N-5 din inelul pteridinic un radical formil și se saturează dublele legături din inelul B cu 4 atomi de hidrogen. Acidul folinic este un derivat tetrahidrogenat al acidului folic, cu denumirea de acid N-5-formil-5, 6, 7, 8-tetrahidropteroil-glutamic. Este un factor activ în anemia pernicioasă. Stimulează creșterea microorganismelor *Leuconostoc citrovorum,* fapt pentru care se denumește și „factor citrovorum". Acidul folinic are un rol important în reacțiile de formilare, de fixare și transfer a grupărilor C_1 (formil, hidroximetil etc.). Acidul folinic se notează prescurtat N-5-COH-FH_4; THCF; FH_4.

Acidul prefolinic, care are la N-5 o grupare $-CH_3$ în loc de gruparea formil, a fost izolat din ficatul de cal. Stimulează creșterea la *L. casei,* dar este inactiv asupra *Str. faecalis.* Se consideră un precursor al acidului folinic, deoarece prin oxidarea grupării $-CH_3$ la formil (-C=O) în prezența FAD sau a vitaminei K, se obține acidul folinic.

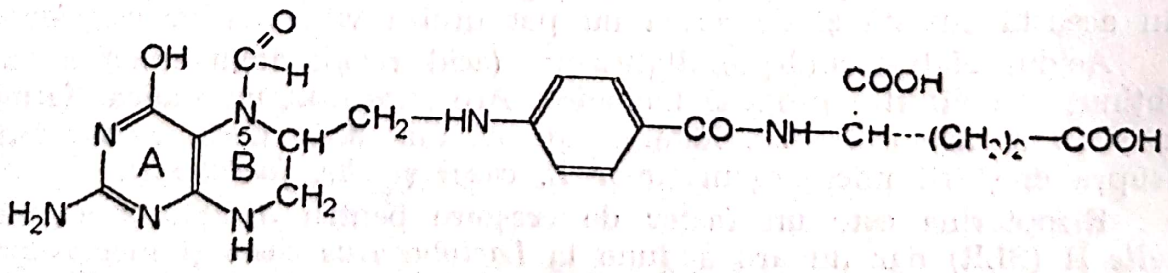
Dintre alți compuși folinici fac parte acidul N-5, 10-metilen-FH_4, implicat probabil în sinteza ADN și acidul N-10-fosforil-FH_4 (fig. 12.6).

Sub aspectul structurii moleculare, toți compușii folici conțin în molecula lor acidul pteroic. Se deosebesc între ei fie prin numărul resturilor de acid glutamic, fie prin fixarea radicalului formil la N-5 și N-10 de acidul folic.

Diferențele de acțiune asupra diferitelor microorganisme și animale depind de capacitatea diferiților compuși folinici de a elibera acidul folic din conjugatele sale, iar ulterior de capacitatea de formilare a acestuia, prin transformarea sa în acid folinic.

12.2.3. ANALOGI PTERIDINICI ACTIVI

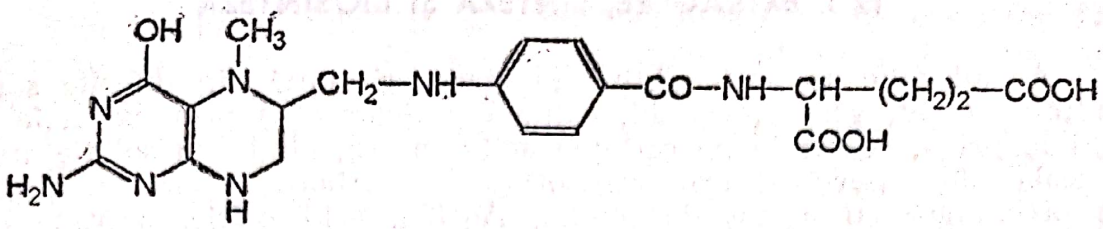
Dintre analogii pteridinici activi face parte xantopterina (2-amino-4, 6-dihidroxipterina, fig. 12.4), izolată inițial din pigmenții aripilor fluturilor. Ulterior s-a extras și din drojdii și ficat. Vindecă anemia



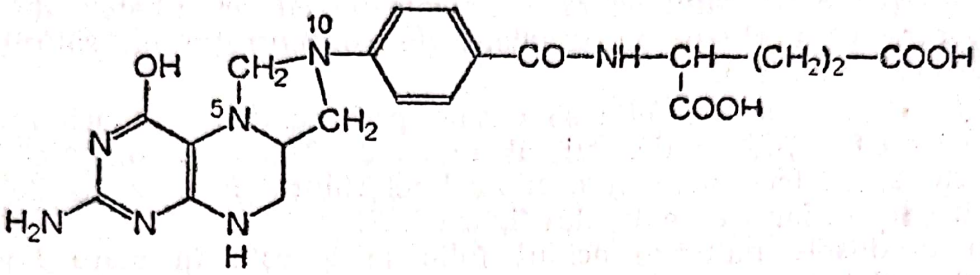
Acid N_5 - formil - 5,6,7,8 -tetrahidro - pteroilglutamic

Fig. 12.5. Structura acidului folinic

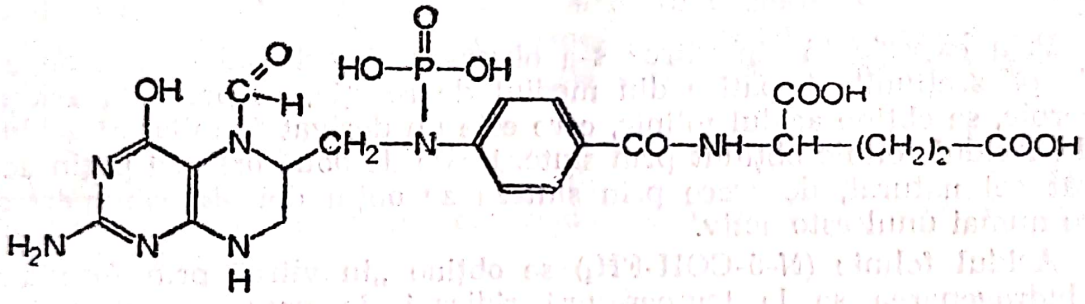
Scanned with OKEN Scanner



Acid prefolinic



Acid N - 5,10 - metilenfolinic



Acid N - 10 - fosforilfolinic

Fig. 12.6. Compuși cu structură folinică

macrocitară a maimuței, fiind denumită și vitamina M. Este posibil ca vitamina M să fie o formă conjugată a acidului folic, iar xantopterina ar fi un precursor al acestuia la maimuță. Xantopterina este eficientă și în anemia nutrițională a șobolanilor, cărora li s-a administrat sulfatiazol, dar nu este activă în anemia pernicioasă la om și nu poate substitui acidul folic în anemia puilor de găină.

Vitaminele B_{10} și B_{11} sunt factori de origine hepatică, a căror legătură cu acidul folic nu este bine precizată. Influențează creșterea puilor de găină și a penajului lor. Indicii 10 și 11 indică prezența altor nouă factori necesari pentru creșterea puilor de găină (vitaminele B_1, B_2, B_6, PP, acid pantotenic, colină, biotină, acid folic și inozitol).

Biopterina (2-amino-4-hidroxi-6-hidroxipropilenpterina) (fig. 12.4) manifestă un efect de economisire a acidului folic la *Crithidia fasciculata* (protozoar).

Prin substituirea grupării carboxilice din molecula acidului pteroic cu $As(OH)_3$ se obține un produs cu acțiune cancerostatică.

Scanned with OKEN Scanner

12.3. EXTRAGERE, SINTEZĂ ȘI BIOSINTEZĂ

Acidul folic se poate obține în stare cristalină din diferite surse naturale (ficat, spanac, drojdii, cojile cerealelor etc.) prin extracție cu apă la pH 3, adsorbție pe cărbune activ (norit), eluție cu soluție amoniacală 2,8%, purificat prin readsorbție pe cărbune, eluare cu anilină și precipitare cu acetat de plumb, $AgNO_3$, acid picric, baritină etc. În prezent se realizează inițial inactivarea enzimelor, care distrug cofactorii naturali prin încălzirea rapidă a materialului la 95°C, în prezență de tampon ascorbat sau amestec cu uree 6M și cloroform. Cromatografierea extractului se face pe coloane cu schimbători de anioni și separare prin eluare în gradient de concentrație cu soluții amoniacale sau de anilină.

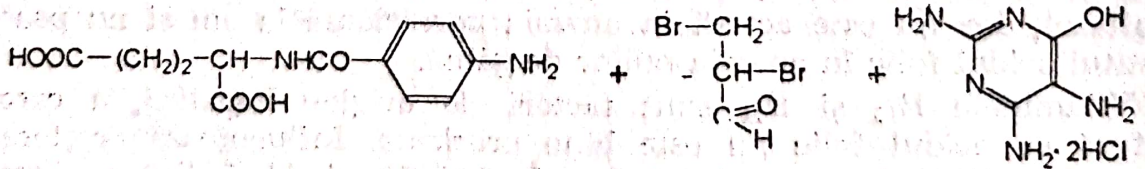
Prin sinteză acidul folic se obține prin condensarea acidului p-aminobenzoil-L(—)-glutamic, cu aldehida 2, 3-dibrompropionică și cu compusul 2, 4, 5-triamino-6-hidroxipiridinclorhidrat în prezență de NaOH O_2 și acetal, conform schemei din figura 12.7.

În produsele naturale acidul folic se găsește în stare liberă în cantitate relativ redusă deoarece se găsește în cantitate mai mare sub formă de compuși chimici diferiți, unii cu mai multe resturi de acid glutamic, care au însă aceeași importanță nutritivă pentru organismele vii.

Prin experiențe „in vitro" s-a observat că prin adăugarea de acid folic pe secțiunile hepatice din mediul de reacție, în prezența acidului ascorbic, se obține acidul folinic, care este un derivat formilat al acidului folic. Acidul folinic obținut prin sinteză este de două ori mai puțin activ decât cel natural, deoarece prin sinteză se obțin doi stereoizomeri din care numai unul este activ.

Acidul folinic (N-5-COH-FH_4) se obține „in vitro" prin formilarea și hidrogenarea sa la temperatură ridicată, în prezența acidului ascorbic, iar „in vivo" sub acțiunea piridinnucleotidreductazei și a vitaminei C, se formează inițial acidul dihidrofolic (FH_2), care prin hidrogenare trece în acidul folinic.

Din extractele obținute din ficat de cal, hidrolizate cu acid acetic și din extractele hepatice de la porc, incubate cu acid formic, ATP și acid folic, s-a izolat acidul N-10-formil-tetrahidrofolic.



Acid p - aminobenzoil - L(-) - glutamic

Aldehidă 2,3 - dibromopropionică

6 - hidroxi - 2,4,5 - triamin pirimidin clorhidrat

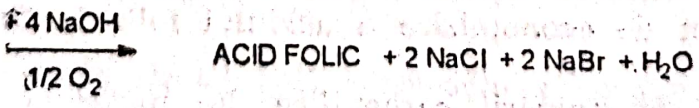


Fig. 12.7. Schema sintezei acidului folic

Prin incubarea celulelor de *Bacillus subtilis* și *Streptococcus faecalis* cu acid folic, s-a obținut un triglutamat al acidului folinic care prin hidroliză eliberează acidul folinic.

Mecanismul biosintezei acidului folic la om încă nu este destul de bine cunoscut. Până în prezent s-au efectuat cercetări în acest domeniu pe microorganisme și pe animale, cu ajutorul unor inhibitori. Acidul folinic este sintetizat de majoritatea bacteriilor intestinale. Biosinteza acidului folic este stimulată de acidul ascorbic.

Experimental s-a dovedit că unele microorganisme sunt capabile să biosintetizeze acidul folic din precursori mai simpli, prin reacții de condensare, sub acțiunea unor enzime. Astfel extractele celulare de *E. coli*, realizează biosinteza acidului folic din acid glutamic, acid p-aminobenzoic și 2-amino-4-hidroxipteridin-6-carboxialdehidă, iar extractele de *Lactobacillus arabinosus* sunt capabile să utilizeze ca și compuși pteridinici 2-amino-4-hidroxi-6-hidroximetilpteridina și 2-amino-4-hidroxi-6-carboxildehidropteridina în prezența ATP și a ionilor de Mg^{2+}. Biosinteza acidului folic se realizează mai repede dacă compușii pteridinici conțin acidul pirofosforic la C-9.

În experiențele efectuate cu *Mycobacterium avium* s-a observat că în prezența ATP, HS-CoA și a acidului p-aminobenzoic se formează un derivat adenilic monofosforic al acidului p-aminobenzoic, care reacționează cu acidul glutamic și formează compusul p-aminobenzoilglutamic. Prin unirea acestui compus cu pterina se formează acidul folic (fig. 12.8).

Extractele de *Clostridium striklandii* au transformat acidul folic în acid dihidrofolic, iar din ficatul puilor de găină s-a izolat un sistem enzimatic capabil să transforme acidul dihidrofolic în acid tetrahidrofolic (fig. 12.9).

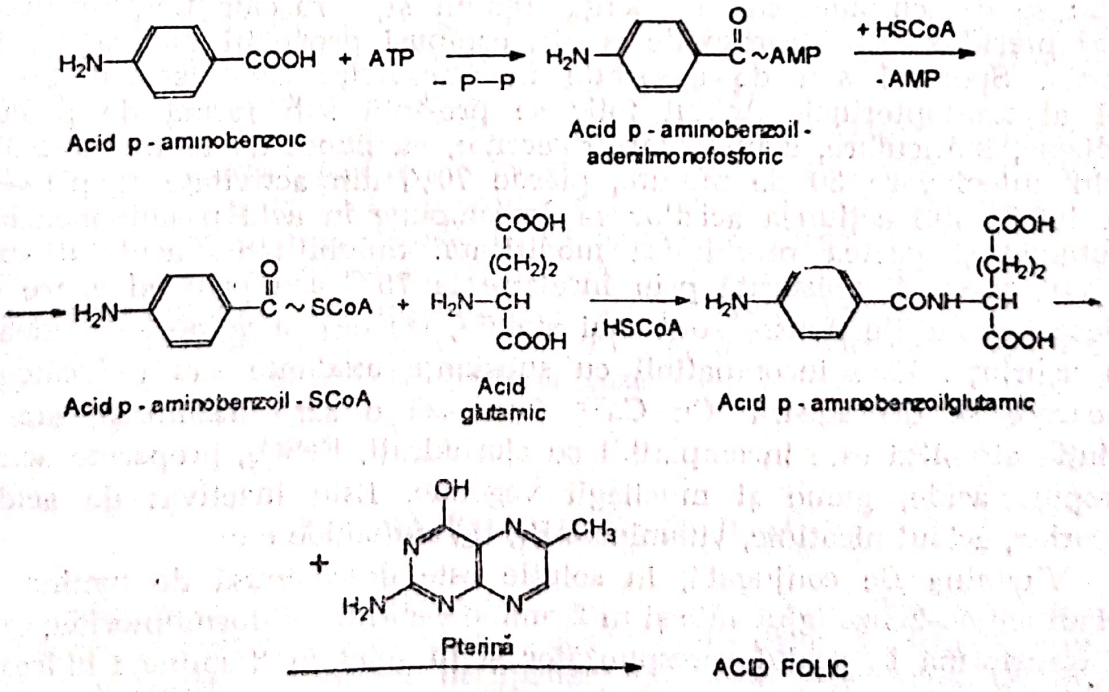


Fig. 12.8. Schema biosintezei acidului folic la *Mycobacterium avium*

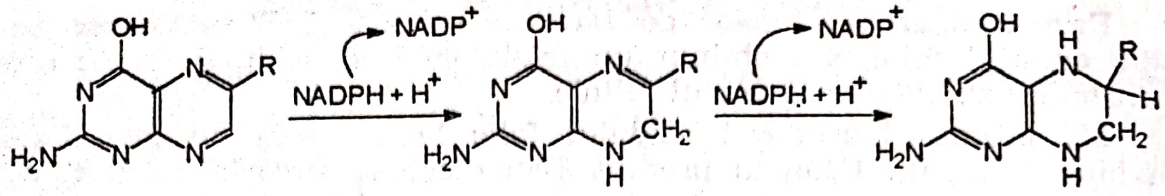


Fig. 12.9. Transformarea acidului folic în acizii dihidrofolic și tetrahidrofolic

Transformarea acidului folic în acid folinic s-a pus în evidență atât la animale (șobolani, iepuri, porc, pui de găină, viței etc.), cât și la microorganisme (*L. casei, Str. faecalis, C. cylindrosporum* etc.) în prezența ATP, FAD, Mg^{2+}, acid ascorbic și a unor enzime specifice. În ficatul puilor de găină s-a identificat o enzimă care în prezența ATP și Mg^{2+} realizează transformarea acidului N-5-tetrahidrofolic în acid N-10-tetrahidrofolic.

$$\text{Acid N—5— tetrahidrofolic} \xrightarrow[Mg^{+2}]{ATP} \text{Acid N—10—tetrahidrofolic} + ADP + P$$

12.4. PROPRIETĂȚI FIZICE ȘI CHIMICE

Acidul folic este o substanță solidă, cristalină, de culoare galbenă, greu solubil în apă (0,16 mg/100 ml), piridină, fenol, în metanol, acid acetic glacial și insolubil în cloroform, benzen, eter și acetonă. Ca sare de sodiu este solubil în apă. Este optic activ dextrogir (+)16°, iar în mediu acid, la pH 4—12 este stabil. Cu ionii metalelor grele formează compuși complecși (cu Fe^{3+} roșu, Cu^{2+} verde, Co^{2+} galben), iar în mediu bazic formează săruri cu metalele alcalino-pământoase. Acidul folic se descompune sub influența luminii și a razelor UV, rezultând acid pteridoxamin-6-carboxilic și alți compuși proveniți din catena laterală. Spectrul său de absorbție în ultraviolet este asemănător cu cel al xantopterinei. Acidul folic se prezintă sub formă de plăcuțe galbene, lenticulare, subțiri, birefrigerente, cu punct de topire la 250°C. Prin autoclavare 30 de minute, pierde 70% din activitate la pH = 1. La 100°C, sub acțiunea acizilor se descompune în acid p-aminobenzoil-glutamic și partea pteridinică modificată. Solubilitatea acidului folic în apă poate fi măsurată prin încălzire la 75°C sau prin adăugare de glicocol. Soluțiile neutre sunt mai stabile, iar cele alcaline se oxidează cu ușurință. Este incompatibil cu substanțe oxidante sau reducătoare deoarece se degradează. Cu Ca^{2+} formează o sare insolubilă, iar în soluție alcoolică este incompatibil cu clorhidrați, $FeSO_4$, preparate acide, siropuri acide, gume și mucilagii vegetale. Este inactivat de acidul ascorbic, acidul nicotinic, vitaminele B_1, B_2, sulfamide etc.

Vitamina B_c conjugată, în soluție este descompusă de lumină în acidul amino-benzoilglutamic și în 2-amino-4-hidroxi-6-formilpterină, care se transformă în acidul corespunzător și în final în 2-amino-4-hidroxi-pterină.

Din datele prezentate reiese în mod convingător că acidul folic este unitatea structurală de bază a unei familii de compuși, cu proprietăți biologice asemănătoare, care se diferențiază între ei prin numărul de molecule de acid glutamic sau prin substituenții de la N-5, C-9, N-10.

12.5. METODE DE IDENTIFICARE ȘI DOZARE

Acidul folic se poate determina fluorimetric în urma transformării sale într-un compus fluorescent, prin oxidare cu $KMnO_4$ și iradiere cu lumină UV, având maxim de absorbție la 265 nm.

Metodele chimice folosesc reacția de reducere a acidului folic cu zinc în HCl 0,5N, în urma căreia reacții se formează o pterină și acid p-aminobenzoic. Prin diazotarea acestuia și cuplarea cu N-naftil-etilendiamina se formează un compus colorat, care se colorimetrează.

Prin descompunerea acidului folic în pterină și acid p-amino-benzoilglutamic, ultimul compus, în prezența nitritului de sodiu, formează un diazoderivat de culoare violetă, care se poate doza colorimetric.

Pentru separarea și identificarea diferiților compuși folici, folinici și coenzimatici se face cromatografierea acestora, purificarea și dozarea lor spectofotometrică.

Metodele microbiologice, aplicate după hidroliza extractelor, sunt mai sensibile și mai specifice. Se folosesc ca test *Lactobacillus casei* L și *Streptococcus faecalis* R. care au o sensibilitate de 0,05μg și respectiv 0,3 μg/ml mediu. Separarea acidului folic de derivații săi naturali se face pe cale enzimatică și se determină cantitatea necesară pentru creșterea microorganismelor respective.

Testele clinice au la bază determinarea conținutului acidului folic și a compușilor acestuia din ser și ficat. Scăderea conținutului acestora sub nivelul normal indică o carență în folați. Mai nou se utilizează și metode radioimunologice (D. J. CASTON, 1974).

Un test biochimic folosit este testul FIGLU, sau testul de histidină. După administrarea „per os" a 20 g de histidină, se elimină în cazuri normale foarte puțin acid urocanic prin urină. În carența folinică și B_{12}, acidul urocanic și acidul forminoglutamic cresc foarte mult, ca urmare a reducerii activității urocanazei și a formiminotransferazei din ficat. Diferențierea avitaminozei folinice de avitaminoza B_{12} se face prin administrarea unei cantități de 0,1 mg acid folic pe zi și urmărirea simptomelor carențiale. Această doză vindecă carența folinică, dar nu și cea a avitaminozei B_{12}.

12.6. RĂSPÂNDIRE ÎN NATURĂ

Acidul folic și derivații acestuia au o largă răspândire în alimente. Se găsesc în cantitate mai mare în ficatul animalelor, în frunzele plantelor superioare, în special în spanac, în mazăre, germenii de grâu, drojdii, sfeclă, lămâi și în unele microorganisme.

Scanned with OKEN Scanner

Conținutul substanțelor pteroilglutamice din plantule de porumb este de 11,5 μg/g, iar în frunzele mature de 6—7 μg/g. În ierburi, conținutul acidului folic variază între 3—7,5 μg/g. Cele mai mari cantități de acid folic și de folați se găsesc în regnul animal. În ficatul de bou se găsesc 290 μg%, în ficatul de pui 370 μg%, iar în cel de porc 220 μg% acid folic. Cerealele conțin în medie 35 μg%, iar dintre fructe lămâile 80 μg%, bananele 30 μg%, portocalele 23 μg%. Legumele au un conținut mai redus, fiind cuprins între 8 și 25 μg%.

O bună parte din acidul folic este sintetizat de flora intestinală, fapt ce îngreunează stabilirea necesităților pentru om și animale.

Acidul folic se găsește în cantități variabile în toate alimentele uzuale. Ficatul și mușchiul mamiferelor sunt sursele cele mai bogate, dar și sursele vegetale constituie un aport însemnat. Laptele de vacă conține cantități mici de acid folic.

În timpul preparării alimentelor o parte din folați se distrug, dar în același timp se eliberează cele aflate în complexe inactive sau sub formă conjugată. Cele mai multe forme de folați nu au stabilitate mare în alimente. Frunzele proaspete pot pierde prin uscare la temperatura camerei până la 70% din activitatea folaților în decurs de trei zile. Cantități mari de folați se pierd în timpul extragerii, la prepararea hranei în soluții apoase și prin fierbere. Uneori pierderile totale se ridică până la 85—90%.

12.7. ABSORBȚIE, EXCREȚIE ȘI NECESITĂȚI

Acidul folic în stare liberă, ca acid pteroilmonoglutamic este ușor și rapid absorbit în organism în cantități până la 15—20 mg/zi. Absorbția are loc mai ales începând din partea proximală a intestinului subțire și continuă, pe toată lungimea sa, cu un consum de energie, cu implicarea unor procese active (energodependente) pentru cantități fiziologice mici. Dozele mari sunt absorbite mai ales prin difuzie pasivă (WHIETECHEAD, 1967; YOSHINO, 1968). În multe produse alimentare acidul folic se prezintă predominant sub forme poliglutamate. Din acești derivați acidul folic este absorbit numai după o deconjugare prealabilă a acestor compuși. În tubul digestiv și în rinichi, s-au pus în evidență existența unor sisteme enzimatice hidrolizante (conjugaze) care scindează complexele acidului folic. Absorbția acidului folic poate fi perturbată și micșorată de diferiți compuși cum sunt difenilhidrantoina, pirimidine, cicloserine, etanol, glicocol, serină, homocisteină și metionină.

Se consideră că acizii folici, precum și derivații acestora, sunt convertiți în mucoasa intestinală sub acțiunea unor acidfolicreductaze în derivați metilici (CH_3-FH_4), forme sub care trec în sângele venei porte și apoi la ficat.

Din totalul de aproximativ 70 mg acizi folici și folinici existenți la oamenii adulți, aproximativ 30—40% se găsesc în ficat (5—15 μg/g), de unde prin circulația sanguină se aprovizionează toate organele și te-

Scanned with OKEN Scanner

suturile. Imediat după absorbție și parțial chiar în timpul absorbției, acidul folic este convertit în diferiți compuși metabolici activi cum sunt:

— acid N-5-formil-tetrahidrofolic (f^5FH_4);
— acid N-10-formil-tetrahidrofolic ($f^{10}FH_4$);
— acid N-5-formimino-tetrahidrofolic ($fiFH_4$);
— acid N-5, 10-metenil-tetrahidrofolic ($f^{5-10}FH_4$);
— acid N-5, 10-metenil-tetrahidrofolic ($h^{5-10}FH_4$);
— acid N-5-metil-tetrahidrofolic (m^5FH_4).

În toți acești derivați apare ca structură de bază acidul tetrahidrofolic (FH_4), care joacă rolul unei coenzime de acceptor și transportor al unei unități C_1.

Acidul folic este transportat în organism sub formă de CH_3-FH_3 legat de proteine transportoare, având în sânge o concentrație de 300 ng/ml. Folații se găsesc în cantitate mai mare în eritrocite, cu variații normale între 160—640 ng/ml de eritrocite. Conținutul folaților din eritrocite, se menține relativ constant și reflectă gradul de aprovizionare al întregului organism cu acești compuși. Cantitatea de folați din sânge scade în bolile de cancer (leucemii), carență folinică și anemie pernicioasă, în ciroză alcoolică, anemii gravidice etc. Plasma sanguină conține 5—20 ng/l, iar eritrocitele conțin cantități de 30 de ori mai mari de folați.

În sânge și țesuturi, acizii folici suferă procese de interconversiune și de catabolizare. Acidul folic se transformă mai ales în derivați tetrahidrofolici. În eritrocite acidul folic prin metabolizare dă naștere la acid p-aminobenzoilglutamic și la un derivat aldehidic al pterinei. În ficat, acidul folinic se degradează în compuși similari, reacția fiind activată de acidul glutamic și inhibată de acidul ascorbic. Tot la nivelul ficatului se transformă acidul folic în acid N-10-formil-folinic.

Unele microorganisme *(Alcalinigenes metalcaligenes)*, sub acțiunea pteridindezaminazei, descompun acizii folici la hidroxiderivații corespunzători.

Eliminarea folaților și a metaboliților acestora se face în cantitate mai mare prin fecale, aproximativ 200—500 µg/zi la omul adult, cuprinzând aproximativ 20% din cantitatea ingerată și partea neabsorbită produsă de flora intestinală.

Excreția prin urină este mică, aproximativ 2—5 µg/zi, dar crește prin administrarea de doze orale, după saturarea organismului cu folați. Eliminarea folaților prin urină reprezintă sub 1% din cantitatea acestora în organism.

Dacă se administrează intravenos doze mici de acid folic (1 µg/kg corp), aproximativ 90% din cantitatea administrată este distribuită din curentul sanguin în tot corpul în decurs de 3 minute, iar aproximativ 2% se elimină prin urină. Dacă însă se măresc dozele până la 150 µg/kg corp, până la 90% din cantitatea administrată se elimină prin urină, în decurs de 6—12 ore, sub formă de acid folic sau derivați apropiați sub aspect structural.

La o dietă normală, corespunzătoare la o ingestie de 600 µg acid folic/zi, cantitatea acestui acid din organism se apreciază a fi între 6 și 10 mg, cantitate suficientă pentru trei sau patru luni, dacă este blocată absorbția. O altă cale de eliminare a acidului folic este cea cutanată.

Scanned with OKEN Scanner

Prin transpirație se elimină cantități destul de însemnate de folați, precum și prin bilă.

Necesitățile organismelor animale în acid folic sunt greu de stabilit deoarece variază în limite foarte largi, depind de compoziția hranei și de biosinteza acestuia de către flora intestinală. Pe de altă parte nici metodele de testare ale acidului folic în diferite țesuturi și microorganisme nu sunt încă performante.

La omul adult necesitatea în acid folic pur este în medie 5 μg/zi. Dacă se ține seama că în alimente acidul folic se află sub forme conjugate și diferiți derivați ai săi, precum și de aportul florei intestinale, de unele dereglări în absorbție care pot apărea, necesitățile practice sunt mult mai mari, fiind cuprinse între 500—1 000 μg/zi. Aceste valori sunt mai reale dacă se apreciază că o rație alimentară normală conține 160 μg folați în stare liberă și 670 μg/zi sub forme conjugate. Doza minimă, care este activă în anemia pernicioasă este de 1 mg/zi. La maimuță, necesitățile de acid folic sunt de 5—10 μg/zi pentru un consum de 325 kcal. Puiul de găină are nevoie de 5 μg pentru 100 g alimente, iar șobolanul 0,5 μg/zi. Creșterea și dezvoltarea unor microorganisme (enterococi, lactobacili, streptococi), necesită acid folic, pentru care acest acid este un important factor de creștere.

12.8. ROL ȘI ACTIVITATE BIOCHIMICĂ

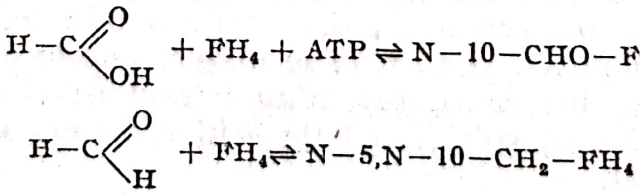
Acizii folici, sub formă de acizi tetrahidrofolici, reprezintă coenzimele unor sisteme enzimatice, implicate în activarea și transportul unor fragmente monocarbonice (C_1) sub formă de hidroximetil ($-CH_2OH$), formil ($-COH$), formiat ($HOOC^-$), metil ($-CH_3$), formimino ($CH{=}NH$), care iau parte în reacții deosebit de importante pentru organism.

Formele coenzimatice active, care poartă fragmente sau radicali cu un atom de carbon, sunt derivați ai acidului tetrahidrofolic (FH_4) din care fac parte:

— acidul N-10-formil-tetrahidrofolic (N-10-FH_4);
— acidul N-5-formil-tretrahidrofolic (N-5-COH-FH_4);
— acidul N-5-N-10-metenil-tetrahidrofolic (N-5, N-10=CH-FH_4);
— acidul N-5-N-10-metenil-tetrahidrofolic (N-5, N-10-CH_2-FH_4);
— acidul N-5-metil-tetrahidrofolic (N-5-CH_3-FH_4).

Structura moleculară a acestor compuși se prezintă în figura 12.10.

Derivații coenzimatici ai acidului tetrahidrofolic se pot obține pe două căi principale: fie prin tratarea directă a aldehidei formice sau a acidului formic cu acidul tetrahidrofolic (FH_4), conform relației.

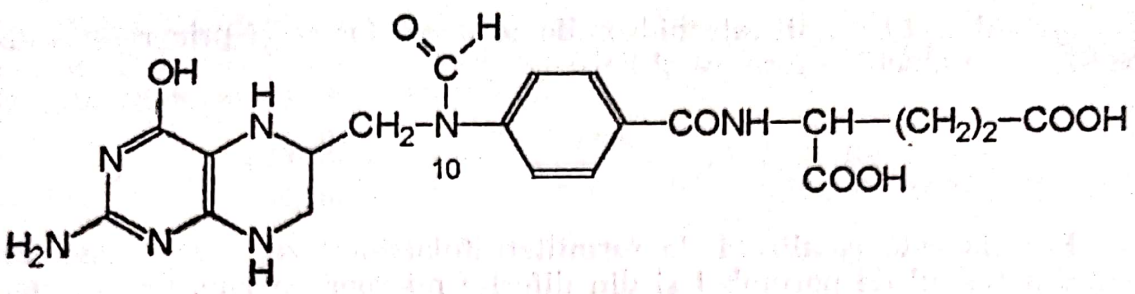


$$H-C(=O)-OH + FH_4 + ATP \rightleftharpoons N-10-CHO-FH_4$$

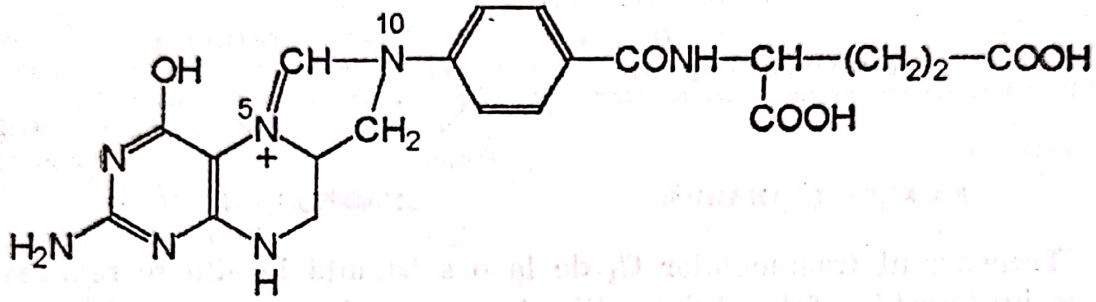
$$H-C(=O)-H + FH_4 \rightleftharpoons N-5,N-10-CH_2-FH_4$$

A doua cale este prin transferul direct al acestor unități pe FH_4. Ca substanțe donatoare de unități C_1, cele mai active sunt serina, histidina, xantina, metionina, colina, betaine, nicotina, timina, acidul gluta-

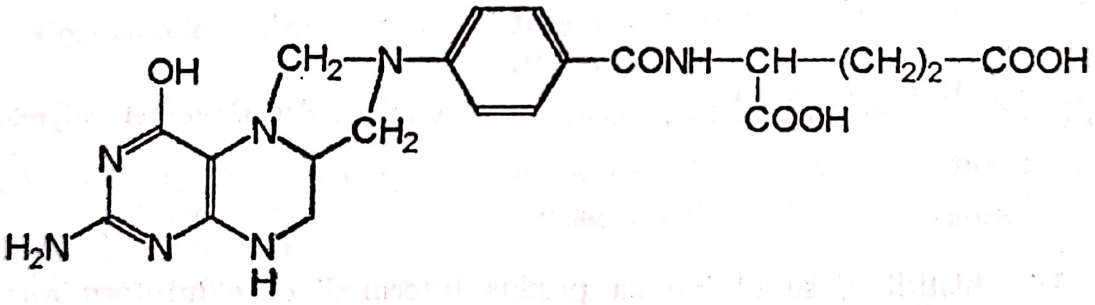
Scanned with OKEN Scanner



Acidul N - $_{10}$ - formiltetrahidrofolic



Acid N - $_5$, N - $_{10}$ - meteniltetrahidrofolic



Acid N - $_5$, N - $_{10}$ - metilentetrahidrofolic

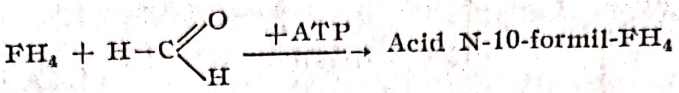
Fig. 12.10. Derivaţi coenzimatici ai acidului tetrahidrofolic

mic etc. Ca acceptori de grupări C_1 fac parte glicocolul, colamina, nornicotina, uracilul, homocisteina, gliconamidoribozida, acidul folic etc.

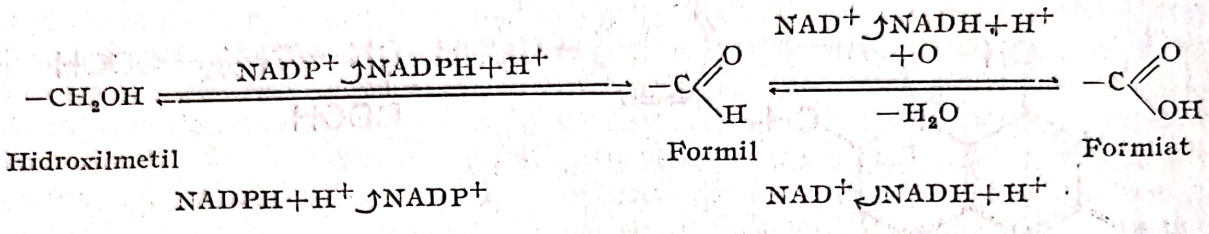
Existenţa acidului N-5-formil-tetrahidrofolic, care este inert sub aspect coenzimatic nu constituie un balast pentru organism deoarece poate fi uşor transformat pe cale enzimatică în acid N-10-metenil-tetrahidrofolic, iar acesta cu apa dă acidul N-10-formil-tetrahidrofolic care este cel mai activ metabolit.

$$\text{Acid N-5-tetrahidrofolic} \xrightarrow[Mg^{2+}]{+ATP \uparrow ADP+P} \text{Acid N-5,N-10-metenil-tetrahidrofolic} \xrightarrow{+H_2O} \text{Acid N-10-formil-tetrahidrofolic}$$

Acidul N-10-formil-tetrahidrofolic se poate forma și prin reacția directă dintre aldehida formică și FH_4:

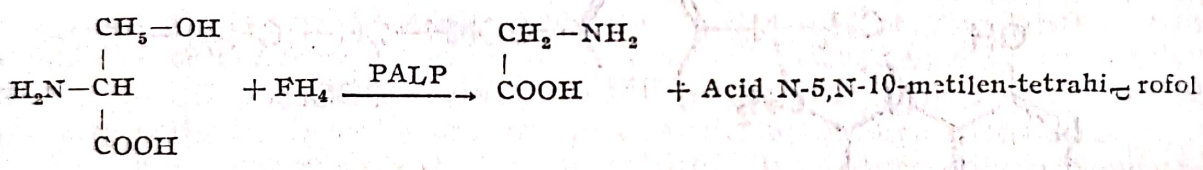


Reacția este catalizată de formiltetrafolatsintetaza, care a fost izolată din ficatul de porumbel și din diferite microorganisme. Fragmentele monocarbonice sunt, sub aspect metabolic, interconvertibile, deoarece pot trece reciproc una în alta, sub acțiunea unor sisteme enzimatice de tipul hidroximetildehidrogenazei în prezență de $NADP^+$ și NAD^+.

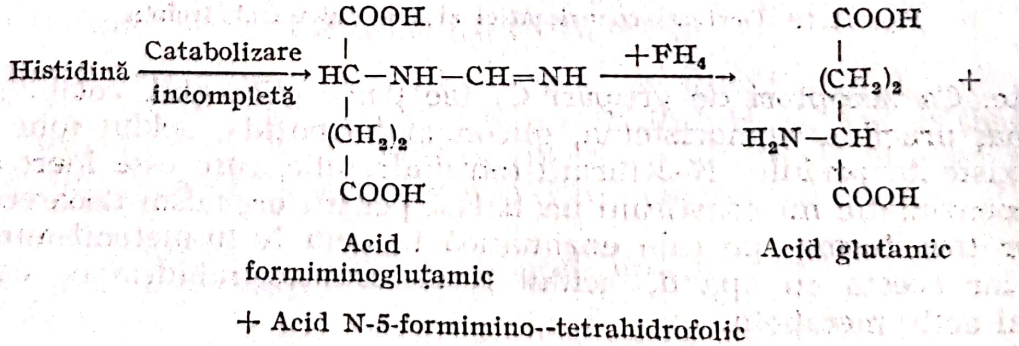


Transportul fragmentelor C_1 de la o substanță la alta se realizează de acidul tetrahidrofolic și derivații săi menționați anterior.

Dintre reacțiile biochimice la care iau parte coenzimele tetrahidrofolice, fac parte și transformarea serinei în glicocol în prezența piridoxalfosfatului (PALP):



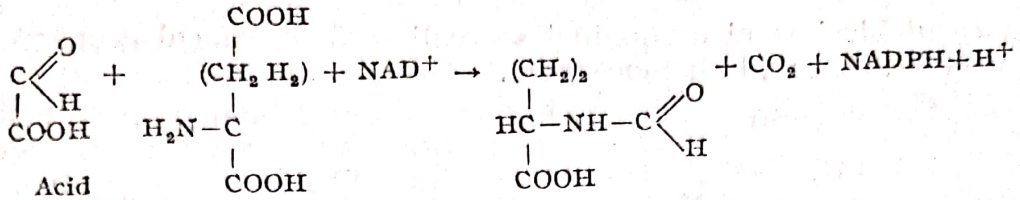
Din histidină, se obține ca produs intermediar acidul formiminoglutamic care transferă radicalul formimino pe FH_4 cu formare de acid N-5-formimino-tetrahidrofolic.



Acidul N-5-formimino-tetrahidrofolic (N-5-fi-FH_4), sub acțiunea unei ciclodezaminaze, formează acidul N-5,N-10-metenil-tetrahidrofolic (N-5, N-10=CH-FH_4). Același mecanism de reacție se produce și la transformarea xantinei în formiminoglicocol.

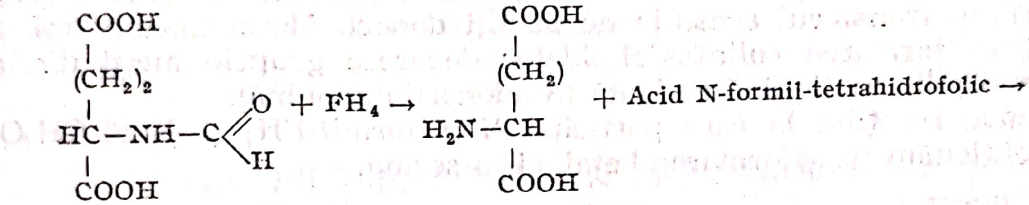
Scanned with OKEN Scanner

Glicocolul, printr-o reacție de transaminare, formează acid glioxalic, care cedează gruparea formil acidului glutamic, în prezență de NAD^+ cu formare de acid N-formil-glutamic.



Acid glioxalic — Acid glutamic — Acid formilglutamic

Acidul formilglutamic cedează radicalul formil acidului FH_4 și se formează acidul folinic, care este mai puțin activ. Acesta în prezența ATP se transformă în acidul N-10-formil-tetrahidrofolic.



Acid formilglutamic — Acid glutamic

$$\xrightarrow[Mg^{2+}]{ATP} \text{Acid N-10-formil-tetrahidrofolic}$$

Coenzimele folinice, care au fixate unități C_1, se comportă ca donori în reacțiile ce necesită acceptarea fragmentelor $-CH_2OH$, $-C\begin{matrix}O\\H\end{matrix}$, $-CH{=}NH$, $HCOO^-$, $-CH_3$. În funcție de felul compușilor care se sintetizează în urma transferului de unități C_1, participă la reacție una sau alta din formele active.

În reacțiile cu cedare de radical formil vor funcționa ca donori acizii N-10-formil-FH_4 și N-5,N-10=CH-FH_4. Ca donori de grupări $-CH_2OH$ este mai activ acidul N-5,N-10-CH_2-FH_4, iar ca donori de radicali $-CH_3$ funcționează acidul N-5-CH_2-FH_4 și uneori și acidul N-5,N-10-CH_2-FH_4.

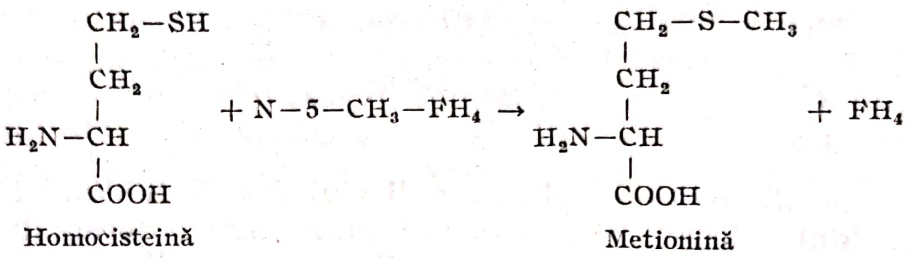
Acceptori de grupări C_1 active sunt mai numeroși în procesul de biosinteză a bazelor și a nucleotidelor purinice, în biosinteza colinei, betainei, nicotinei etc. În procesul de biosinteză a bazelor purinice sunt cedate două grupări formil, localizate la C-2 și C-8 al nucleului purinic. Dintre compușii intermediari care se formează în procesul de biosinteză a bazelor purinice, în urma primirii unor unități C_1 active fac parte formilglicinamidoribozida (FGAR), formilaminoimidazolcarboxiamidriboziza (FAICAR). Datorită participării coenzimelor folinice în biosinteza nucleotidelor purinice, care iau parte la formarea acizilor nucleici, reiese rolul important pe care îl au acizii folici în procesele de creștere și reproducere celulară.

Acidul N-5,N-10-metilen-FH_4 are un rol însemnat în biosinteza ADN, deoarece se comportă ca o coenzimă în reacția de transformare a uracilului în nucleozide și nucleotide în timină. El donează un radical metil la 2'-dezoxiuridin-nucleotide (sau nucleozide) și acestea se trans-

Scanned with OKEN Scanner

formă în 2'-dezoxitimidin-nucleotide, respectiv nucleozide. Transformarea uracilului în timină se face în molecula nucleotidelor (nucleozidelor), care reprezintă cărămizile de bază în biosinteza acidului dezoxiribinucleic.

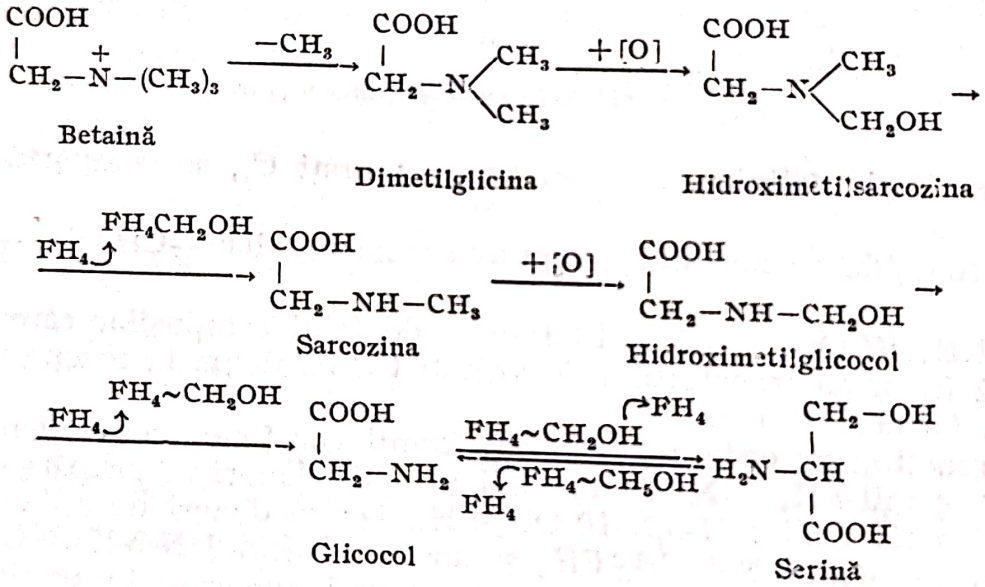
În cazul biosintezei metioninei se realizează transferul grupării metil de la N-5-CH_3-FH_4 la homocisteină.



Homocisteină — Metionină

În procesul de biosinteză a metioninei se produce neogeneza grupei metil și nu transferul acestuia de la alți donori. Metionina are rol însemnat în formarea colinfosfolipidelor deoarece grupele metil din colină provin din metionină activată (S-adenozilmetionină).

Dintre reacțiile la care participă N-10-formil-FH_4 și N-10-CH_2OH-FH_4 menționăm transformarea betainei în serină.



Ultima reacție este reversibilă fapt important deoarece serina se poate transforma în glicocol, constituind o importantă sursă de fragmente -CH_2OH.

Există date experimentale care dovedesc că timina poate substitui acidul folic în stimularea creșterii unor microorganisme *(Str. faecalis)*, iar efectul optim al acidului folic asupra acestor microorganisme se obține când se administrează împreună cu vitamina B_{12}. Datorită acestor corelații se consideră că acidul folic funcționează direct sau indirect ca o coenzimă în biosinteza tiaminei. Unele microorganisme transformă ușor uracilul în timină sau citozină, dar pentru biosinteza timinei au nevoie de acid folic. În prezența formiatului marcat cu ^{14}C, acesta se regăsește în atomul de C al grupării metil din timină.

Acidul N-5-formil-tetrahidrofolic, pe lângă transformarea glicocolului în serină și a homocisteinei în timină, contribuie activ la transfor-

Scanned with OKEN Scanner

marea uraciilului în timină și a metioninei în creatină, precum și la biosinteza inelelor porfirinice. Prin administrarea de formiat marcat cu ^{14}C în hrana șobolanilor tratați cu acid folic, atomul ^{14}C se regăsește în hem, numai la animalele tratate cu acid folic, nu și la cele aflate în carență de folați.

Acidul folic stimulează activitatea colinesterazei, a cărei diminuare ar duce la o creștere a acetilcolinei, cu influență negativă asupra hematopoiezei, dar inhibă activitatea tirozinazei și a xantinoxidazei. Acidul tetrahidrofolic stimulează biosinteza nucleelor porfirinice și a nucleoproteidelor. La maimuțe cu deficiențe de acid folic, conținutul nucleoproteidelor scade în mod accentuat, iar situația se redresează prin administrare de acid folic.

Acidul folic este un factor important pentru creșterea animalelor tinere și pentru diferite microorganisme. Este utilizat tot mai mult în lupta împotriva cancerului. Asigură funcționarea optimă a sistemului nervos. A manifestat efecte antiteratogene la animalele tratate cu pirimetamină.

12.9. HIPOVITAMINOZE ȘI HIPERVITAMINOZE

Carența în acizi folici și folinici determină la om apariția anemiei macrocitare asociată cu megaloblastoza care se caracterizează prin formarea unor celule gigantice în măduva spinării și a unor eritrocite imature. Se produce o dereglare a procesului de hematopoieză care determină apariția anemiei, agranulocitoză și trombocitopenie. În măduva spinării apar modificări care determină apariția eritropoiezei megaloblastice. Este dereglată și funcționarea mucoaselor epiteliale. Apar ca efecte secundare ulcerații, infecții, tulburări gastro-intestinale, glosite, neuropatii periferice. Modificările hematologice sunt însă cele mai caracteristice.

Carența pteroilglutamică poate să aibă la om mai multe cauze:

— lipsa din alimentație a acidului folic, acidului folinic și a formelor conjugate, în special a vitaminei Bc conjugată;
— lipsa sau inactivarea conjugatelor intestinale necesare eliberării acidului folic, ca formă ușor absorbabilă din conjugatele sale;
— incapacitatea de transformare enzimatică a acidului folic în acid folinic, formă activă în numeroase procese metabolice;
— absorbția defectuoasă a acidului folic, datorită unor tulburări intestinale;
— inactivarea acizilor folici și folinici datorită prezenței unor inhibitori (antivitamine);
— lipsa din alimentație a unor factori vitaminici, necesari absorbției folaților (vitamina B_{12}, acidul ascorbic).

Acizii folici și folinici constituie factori antianemici cu acțiune în tratamentul anemiilor megaloblastice. Acidul folic este utilizat cu succes în tratamentul anemiilor nutriționale, incluzând anemia pernicioasă la gravide. El stimulează biosinteza globulelor albe și roșii, dar nu are acțiune asupra afecțiunilor nervoase ale acestor boli.

Scanned with OKEN Scanner

Rezultatele în combaterea anemiilor sunt mai bune dacă tratamentul cu folați se face în asociere cu vitamina B_{12}.

Vitamina B_{12} nu are efect asupra anemiei nutriționale asupra căreia are efect acidul folic și derivații acestuia, dar are acțiune asupra anemiei pernicioase, influențând favorabil atât tabloul sanguin, cât și afecțiunile neurologice, pe care acidul folic nu le corectează. Acidul folic vindecă și anemiile provocate cu raze X. El rămâne substanța terapeutică de selecție în anemiile macrocitare, altele decât anemia pernicioasă.

Acidul folic este absolut necesar funcționării normale a aparatului hematopoietic. Acidul folic este necesar și pentru evitarea anemiei la puiul de găină, șobolan, iepuri, porci etc. La maimuță, carența în folați se manifestă prin scăderea în greutate, anemie, leucopenie, granulocitoză și tendința de diaree. Aceste simptome cedează la tratamentul cu acid folic. La puiul de găină carența în acid folic se manifestă prin încetinirea creșterii, anemie macrocitară hipocromă, leucemie, perturbări în formarea și pigmentarea penelor, paralizie. La alte animale, carența în acid folic este însoțită de carența în vitamina PP și a acidului pantotenic.

Acidul folic are efecte favorabile atât asupra biosintezei eritrocitelor cât și a creșterii conținutului de hemoglobină. În carența folinică se produce o hipersegmentare a leucocitelor polinucleare (neutrofile, eozinofile, bazofile), apar eritrocite macroovalocite, celulele din măduva spinării rămân mari (megaloblaste) și nu se divid. Carența în folați este mai frecventă în ultima perioadă la alcoolicii cronici, la persoanele subnutrite, la pacienții cu anemii hemolitice, la copii cu viermi intestinali, în artrite reumatoide și în cancer, deoarece celulele canceroase sunt mari consumatoare de folați. Carența în folați este destul de greu de deosebit de carența vitaminei B_{12}. Ca simptome majoritare în carența folinică se remarcă împiedicarea formării celulelor noi la toate nivelele, acest rezultat duce la apariția anemiei, dereglări în creșterea oaselor și a părului, inflamarea și dereglarea mucoaselor epiteliale. În stare carențială, concentrația acidului folic din eritrocite și ser este mult scăzută și se intensifică eliminarea prin urină a acidului formiminoglutamic, care provine din histidină. Simptomele observate clinic includ apariția celulelor megaloblaste în măduva spinării, anemie macrocitară, leucopenie și hipersegmentarea leucocitelor și eritrocitelor. În sânge apar eritrocite mari, imature, incomplet dezvoltate. Dacă nu se efectuează tratamente la scurt timp după apariția anemiei megaloblastice, aceasta devine fatală.

În carență acută de folați, datorită administrării de antivitamine la început scade apetitul persoanelor supuse experimentului, apar dureri abdominale, diaree cu slăbire puternică, căderea părului, ulcere, și la scurt timp se instalează anemia megaloblastică. Apar de asemenea dermatite și afecțiuni neurologice depresive, iritabilitate, oboseli, scăderi în greutate etc.

Pacienții care sunt tratați pentru epilepsie, cancer, infecții intestinale, hemodializă, precum și femeile care iau contraceptive orale, au un grad mai mare de risc pentru apariția carenței folinice. Este necesar să se controleze conținutul folaților la femeile gravide și în perioada de lactație, când consumul acestor substanțe este mai mare și a se îm-

Scanned with OKEN Scanner

bunătăți alimentația în folați dacă este necesar, spre a evita apariția anemiei la copiii nou născuți.

Carența acută de folați trebuie raportată la scurt timp de la apariția simptomelor, pentru a lua măsuri rapide și eficiente de tratament. Întârzierea aplicării tratamentului poate determina instalarea unor afecțiuni ireversibile cu repercusiuni grave, în multe cazuri fatale.

Hipervitaminoze. Toxicitatea acidului folic și a derivaților acestuia este foarte redusă. Doza letală medie (DL_{50}) pentru șobolan și șoarece variază în jur de 0,5—0,7 g/kg corp, injectată intravenos. Administrarea unor doze mari de folați la animale nu provoacă dereglări metabolice. La șobolani, administrarea unor supradoze de acid folic determină apariția unor afecțiuni renale și apariția acidului folic sub formă cristalină în urină (SIMONS, 1968). Afecțiuni renale similare se observă și la iepuri după o lungă perioadă de administrare a unor doze de acid folic de 40—75 mg/kg corp, timp de 10 săptămâni.

La oamenii cu alimentația variată și echilibrată în principii nutritive nu s-au semnalat hipervitaminoze.

Prin administrarea a 200 mg/zi de acid folic la oamenii adulți nu s-au semnalat dereglări metabolice. Tratamentele cu acid folic nu sunt recomandabile în leziuni neurologice care apar în anemia pernicioasă.

12.10. INTERRELAȚII VITAMINICE

Experimental s-a dovedit că efectul folaților în tratamentul diferitelor afecțiuni este mult mai eficient dacă sunt administrați împreună cu alte vitamine din complexul B și cu vitamina C, care sunt implicate în reacțiile metabolice ce necesită acizii folici și derivații acestora. Vitamina C contribuie la protejarea folaților în alimente și o carență în vitamina C produce și o reducere a conținutului folaților.

Biosinteza acidului folic este stimulată de acidul ascorbic. În carență de acid ascorbic se excretă prin urină o cantitate mai mică de acid folic, chiar în condițiile suplimentării hranei cu acid folic. La maimuțele cu scorbut apare și o anemie megaloblastică, care se vindecă prin administrare de acid folic.

Timina și timidina (nucleozid) pot înlocui în unele procese metabolice acidul folic și cel folinic, deși pentru a obține același efect sunt necesare doze mai mari. Dacă se compară acțiunea timinei cu a acidului folic și a vitaminei B_{12} se constată că 10 g de tiamină date oral sunt echivalente cu 10 mg de acid folic date tot oral și cu 6—23 μg de vitamină B_{12} administrată intravenos

Unele xantopterine au efect hematopoietic, în vindecarea anemiilor nutriționale provocate la șobolani prin nutriția lor cu lapte de capră. Ele vindecă și leucopenia și anemia șobolanilor provocate prin administrarea de sulfatiazol. Xantopterina este inactivă în anemia pernicioasă și nu înlocuiește acidul folic în vindecarea anemiei puilor de găină.

Acizii folici prezintă relații reciproce foarte strânse cu vitamina B_{12}. În starea carențială a vitaminei B_{12} se produce și o scădere a nivelului acizilor folici. Suplimentarea hranei cu acizi folici ameliorează carența în vitaminele B_{12}, PP, colină, biotină și acid pantotenic. Acidul

Scanned with OKEN Scanner

folic administrat în cantități mari la șobolan, în doze de 15 mg/zi, timp de 15 zile, determină o scădere a conținutului vitaminei B_1 din ficat cu 50%, în creier cu 20%, dar nu afectează conținutul renal.

Asocierea folaților cu acidul ascorbic crește activitatea colinoxidazei în omogenatul hepatic de șobolan și biosinteza hemoglobinei la puiul de găină. Acidul folic are efecte favorabile în tratarea scorbutului, chiar și în absența vitaminei C, dar la copii agravează simptomele articulare și cele neuromusculare.

Animalele tratate cu doze mari de tiroxină (500 μg/zi) manifestă o carență folinică, în special a formelor coenzimatice cu acidul tetrahidrofolic și crește excreția prin urină a fragmentelor C_1. În urma tiroidectomiei scade conținutul folaților din ficat.

Între acțiunea vitaminei B_{12} și acidul folic, pe lângă efectul sinergic ce-l au asupra hematopoiezei, manifestă și un antagonism parțial, deoarece acțiunea de inhibare a D-aminoxidazei și xantinoxidazei de către acidul folic este suprimată de vitamina B_{12}. Acest antagonism se manifestă și în tratamentul anemiei pernicioase. În timp ce acidul folic agravează leziunile nervoase din anemia megaloblastică biermeriană, vitamina B_{12} are acțiune curativă asupra acestor leziuni.

Acidul folic stimulează absorbția vitaminelor liposolubile. În carență folinică se produce și o hipoprotrombinemie datorită resorbției defectuoase a vitaminei K, o hipocalcemie datorită insuficienței vitaminei D și tulburări ale vederii la întuneric, rezultând din resorbția defectuoasă a vitaminei A.

Acidul p-aminobenzoic stimulează biosinteza acidului folic.

În procesul de biosinteză și metabolizare a bazelor azotate purinice și pirimidinice, acidul folic stabilește relații cu vitaminele B_1 și PP.

12.11. ANTIVITAMINE

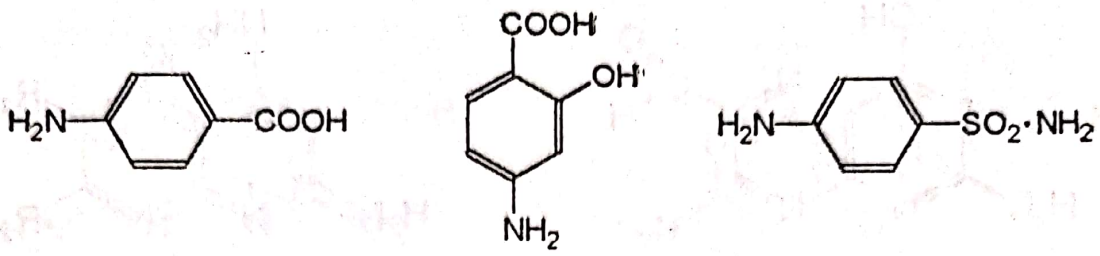
Există numeroși compuși chimici cu acțiune antagonistă față de acizii folici și folinici, care sub aspect structural pot fi repartizați în două grupe. Din prima grupă fac parte analogii structurali ai acizilor folici și analogii structurali ai unor părți din molecula acizilor folici (cum sunt acidul glutamic, acidul paraaminobenzoic, derivați pteridinici etc.), iar în grupa a doua intră unii compuși care interferează cu unele componente metabolice pentru care acțiunea acizilor folici este fundamentală.

Din prima grupă fac parte *sulfamidele, metilpterinele, aminopterinele, acidul metilpteroilglutamic*, acizi care conțin în locul acidului glutamic alți aminoacizi.

Din grupa a doua fac parte *derivații purinici* (2,6-diaminopurina), *derivații pirimidinici* (5-nitrouracilul, 2,4-diaminopirimidina), *derivații pterinici* (2,4-diamino-6,7-difenilpterina) etc. Compușii antivitaminici pot inhiba activitatea enzimelor folinice cu consecințe grave asupra a numeroase procese metabolice.

Dintre antagoniștii structurali ai acizilor folici o largă întrebuințare terapeutică o au sulfamidele, care au o structură similară cu a acidului p-aminobenzoic din constituția acizilor folici (fig. 12.11).

Scanned with OKEN Scanner



Acid p - aminobenzoic | Acid p - amino - salicilic | Sulfanilamidă

Fig. 12.11. Structura acidului p-aminobenzoic, a sulfamidei şi a acidului p-aminosalicilic

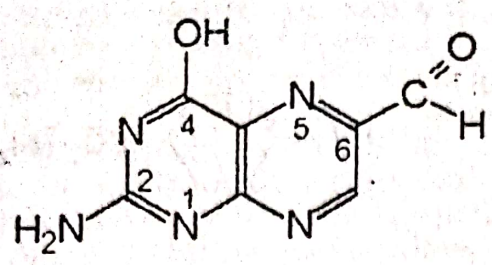
Între acidul p-aminobenzoic şi sulfamide există un antagonism structural de tip competitiv în numeroase procese metabolice. Sulfamidele inhibă biosinteza bazelor purinice şi pirimidinice, biosinteza metioninei şi a inelelor porfirinice, în care acidul folic are un rol de bază. Un antagonist structural însemnat al acidului p-aminobenzoic (PAB) este şi acidul p-aminosalicilic (PAS), care substituie PAB-ul în molecula acidului folic în terapia tuberculozei.

Sulfamidele inhibă biosinteza acizilor folici în microorganismele capabile de aşa procese metabolice, datorită antagonismului ce-l manifestă faţă de acidul p-aminobenzoic (PAB) care intră în structura acizilor folici. Omul şi animalele superioare nu pot biosintetiza acidul folic şi necesită aportul său exogen, inclusiv cel produs de flora intestinală. În aceste situaţii sulfamidele nu intră în competiţie cu PAB în procesul de biosinteză a acizilor folici, cu excepţia florei intestinale producătoare de acizi folici pe care o inhibă şi pot determina o carenţă folinică. Pe acest principiu se bazează chimioterapia modernă, folosind diferite tipuri de sulfamide ca analogi competitivi ai PAB-ului. Tratamentele cu sulfamide sunt larg utilizate în terapia infecţiilor cu stafilococi, streptococi, meningococi, în dizenteriile bacilare, febră tifoidă, holeră, toxiinfecţii alimentare, în infecţiile aparatului urogenital, în meningită meningococică, în combaterea septicemiilor etc., precum şi în pregătirea preoperatorie a pacienţilor (A. WAKER, H. KOLM, M. EBERT, 1958, citaţi de BEDELEANU, 1985).

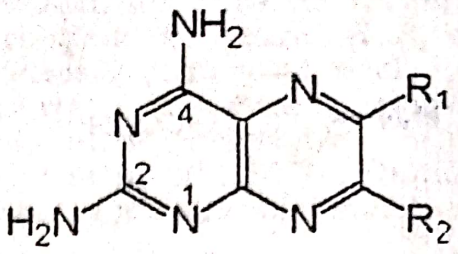
Dintre derivaţii pteridinici, antagonişti ai acizilor folic, fac parte aminopterina (2-amino-4-hidroxi-6-formilpterină), în care gruparea OH de la C-4 este înlocuită cu gruparea $-NH_2$, fiind un compus foarte toxic, care în doză de 7 mg/kg corp produce moartea şoarecelui. Tot din această grupă face parte 2,4-diaminopteridina (fig. 12. 12), 2,4-diamino-6-metilpteridina.

Antivitaminele pteridinice inhibă puternic dihidrofolatreductaza tisulară, fapt ce are ca repercusiuni oprirea transformării acizilor folici în acizi folinici coenzimatici, cu consecinţe negatice asupra diviziunii şi dezvoltării celulelor normale, în timp ce celula tumorală are un turnover number (înmulţire) cu mult mai mare decât a celulelor sănătoase. O inhibiţie similară o produc şi compuşii antimalarici de tipul pirimetazinei, precum şi antagoniştii 2,4-diamino-5-p-clorfenil-6-etil-pirimidina; 2,4-diamino-chinazolina; 2,4-diamino-triazine etc. (fig. 12.13).

Scanned with OKEN Scanner

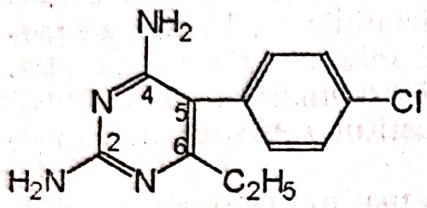


Aminopterină
(2-amino-6-formil-4-hidroxi-
pteridină)

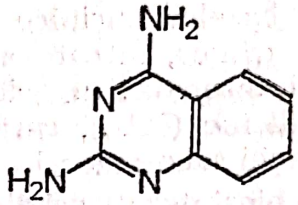


2 , 4 - diaminopteridină

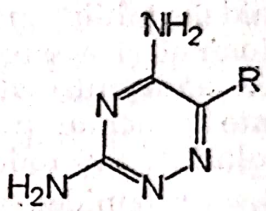
Fig. 12.12. Structura moleculară a unor derivaţi antagonişti pteridinici



2,4 - diamino - 5 - p - clorofenil
- 6 - etilpirimidină



2,4 - diaminochinazolină



2,4 - diaminotriazină

Fig. 12.13. Structura unor antagonişti pteridinici

O altă grupă de antagonişti ai acidului folic o constituie acizii metil-folici (acidul C-7 şi acidul C-9-metilifolici) care conţin la C-7' şi respectiv C-9 o grupă metilică. Ei inhibă creşterea microorganismelor *Lactobacillus casei, Streptocossus faecalis R.* Tot în această subgrupă de antagonişti se încadrează şi acizii N-10-metil-pteroic, acidul pteroil-aspartic, la care acidul gluconic este înlocuit cu acidul aspartic (fig. 12.14).

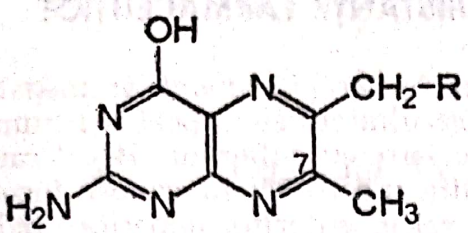
Dintre inhibitorii acidului folic cu structură purinică şi pirimidinică, care biochează biosinteza bazelor azotate, mai cunoscuţi sunt 2,6-diaminopurina; 5-nitrouracilul; 2,6-aminopirimidina (fig. 12.15).

Antagoniştii purinici şi pirimidinici inhibă atât biosinteza bazelor azotate, cât şi biosinteza acizilor nucleici şi a proteinelor.

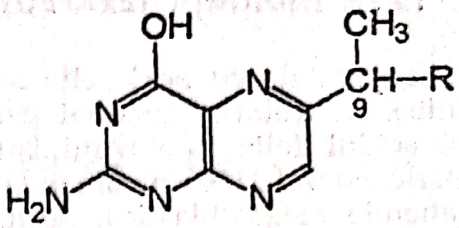
Antivitaminele cu grupări metilice blochează formarea dar nu şi utilizarea acidului folic, iar derivaţii aminaţi inhibă atât formarea cât şi utilizarea acidului folic. Efectul antagoniştilor cu grupări metilice poate fi micşorat sau anulat prin administrarea unor doze mai mari de acid folic. La bolnavii de leucemie, trataţi cu antifolice creşte conţinutul acidului formiminoglutamic.

Efectul acestor două categorii de antagonişti se explică prin mecanisme diferite. Inhibarea dihidrofolatreductazei împiedică transformarea acidului folic în coenzime active. În culturi de celule este blocată biosinteza acizilor nucleici prin inhibarea reacţiilor de transformilare care au loc în procesul de biosinteză a bazelor azotate. La celulele canceroase se produc efecte similare cu puncte de atac şi la nivelul ADN.

Scanned with OKEN Scanner

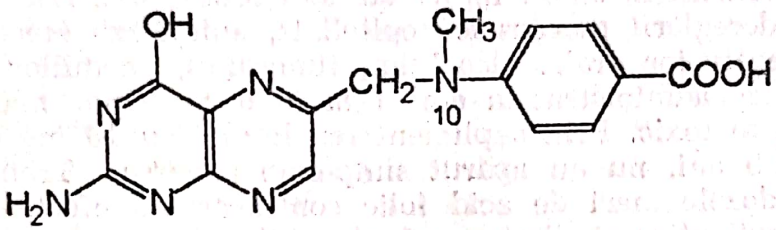


Acid C - 7 - metilfolic

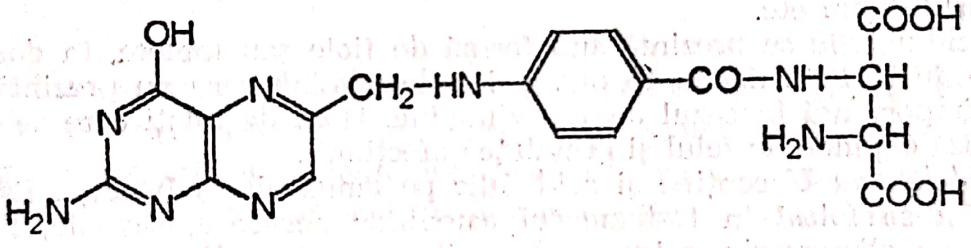


Acid C - 9 - metilfolic

unde R = acid p - aminobenzoilglutamic

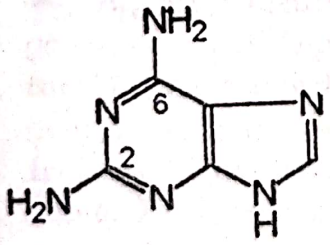


Acid N - $_{10}$ - metilpteroic

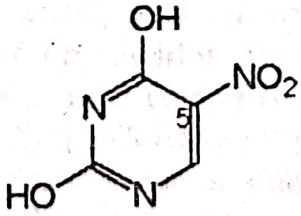


Acid pteroilaspartic

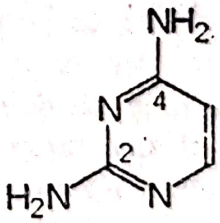
Fig. 12.14. Structura unor antagonişti metil-folici şi pteroilaspartic



2,6 - diaminopurină



5 - nitrouracilul



2,4 - diaminopirimidină

Fig. 12.15. Structura unor antagonişti purinici şi pirimidinici

Antivitaminele folice dau rezultate pozitive în tratamente clinice ca substanţe anticanceroase (antileucemice), dar toxicitatea lor mare restrânge aria de utilizare.

Scanned with OKEN Scanner

12.12. INDICAȚII TERAPEUTICE ȘI SUBSTANȚE FARMACEUTICE

Preparatele cu acid folic se utilizează în terapia anemiilor megaloblastice. În tratarea anemiei pernicioase rezultatele sunt pozitive numai dacă acidul folic este administrat în asociere cu vitamina B_{12}. Tratamentele cu folați se recomandă și în colită ulceroasă, în cancer însoțit de anemie megaloblastică, dermatite seboreice, enterite, hepatită epidemică, insuficiență cardiacă, în terapia cu sulfamide și antibiotice, acnee rozacee etc. Acidul folic nu se va utiliza în tratarea anemiilor megaloblastice cu leziuni nervoase, care se agravează sub acțiunea sa.

În preparate terapeutice multivitaminice, conținutul acidului folic este cuprins între 400 și 500 μg. Dacă se suplimentează hrana la gravide până la 5 mg de acid folic se reduce în mod simțitor apariția de malformații la noii născuți. La fel trebuie procedat și cu persoanele epileptice. Tratamentele cu 10 mg/zi de acid folic reduc riscul apariției cancerului, a dereglării mucoaselor epiteliale, anihilează efectul negativ al contraceptivelor orale, alcoolului, fumatului, anemiilor etc.

Acidul folic administrat la om oral în doze chiar mai mari de 15 mg/zi nu este toxic. Prin suplimentarea hranei cu 10 mg/zi de acid folic, timp de 5 ani, nu au apărut simptome adverse. Trebuie totuși menționat că dozele mari de acid folic contracarează efectele medicamentelor antiepileptice și diminuează absorbția zincului.

Acidul folic se adaugă în numeroase produse alimentare pentru a le mări valoarea biologică, prevenirea anemiilor, buna funcționare a eritrocitelor și a sistemului nervos. Acidul folic se adaugă în special în produse de patiserie, pâine, sucuri, băuturi nealcoolice, cereale pentru micul dejun etc.

Acidul folic se prezintă sub formă de fiole sau tablete, în doze variabile de la 1—2 mg la 15 mg. Calea de administrare nu prezintă prea mare importanță în cazul acestei vitamine. Doza de folați care se administrează depinde de felul și gravitatea afecțiunii.

Folcisteina U conține și acid folic pe lângă alte substanțe. Este indicată a se folosi în tratamentul asteniilor nervoase, sexuale, în tulburări de climacteriu, migrene, hepatite cronice, poliartroze etc.

Benexolul este un preparat farmaceutic care alături de acid folic conține vitaminele B_1 și B_6, cu efecte cardiotonice, detoxificante și antineuritice.

Scanned with OKEN Scanner

Capitolul 13. ACIDUL PANTOTENIC

13.1. Scurt istoric 320
13.2. Structură moleculară 320
13.3. Obținere, sinteză, biogeneză 333
13.4. Proprietăți 331
13.5. Metode de identificare și dozare 336
13.6. Răspândire în natură 337
13.7. Absorbție, excreție și necesități 338
13.8. Rol și activitate biochimică 340
13.9. Hipovitaminoze și hipervitaminoze 342
13.10. Interrelații vitaminice 344
13.11. Antivitamine 345
13.12. Indicații terapeutice și substanțe farmaceutice 345

Acidul pantotenic face parte din *„Complexul de vitamine B"*, fiind unul din cei mai răspândiți reprezentanți. Denumirea sa actuală provine de la semnificația cuvintelor grecești „pas pantos — peste tot", care reflectă larga sa răspândire în natură, fiind prezent în toate organismele animale și vegetale. Are un rol biochimic însemnat, luând parte activă la numeroase procese metabolice din celule și țesuturi.

Denumirile anterioare ale acidului pantotenic au fost de *vitamina B_3, B_5, Bx, factorul antidermatitic, factorul antipelagros al puiului de găină, factorul hepatic filtrant* etc. Acidul pantotenic se găsește în natură în stare liberă, sub forma unor complexe cu proteinele și component în structura coenzimei A (HSCoA). Are un rol important în nutriția și în creșterea animalelor. Previne și vindecă dermatita puilor de găină. În stare carențială a acidului pantotenic apar la animale numeroase dereglări metabolice, dintre care cele mai semnificative sunt oprirea creșterii, tulburări gastrointestinale, depigmentare, descuamare, alopecie, anemie, leziuni ale glandelor suprarenale și ale sistemului nervos, tulburări în sinteza de anticorpi, deshidratare etc., toate aceste afecțiuni reflectând rolul metabolic important ce revine acestei vitamine în diferite procese metabolice.

Scanned with OKEN Scanner

13.1. SCURT ISTORIC

Acidul pantotenic a fost considerat un component al complexului „Bios", descoperit de *E. Wildiers* în 1901, care stimulează creşterea drojdiilor pe medii artificiale. Din complexul „Bios", *R. J. Williams*, şi *J. H. Truesdail* reuşesc în 1931 să separe o fracţiune acidă, care singură stimulează creşterea drojdiilor. Întrucât acest component s-a extras ulterior din numeroase surse naturale (coji de cereale, drojdii, melasă, ficat, tărâţe de orez etc.), *R. J. Williams* şi colab., îi atribuie în 1933 numele de *acid pantotenic*, datorită răspândirii sale universale (panthoten — peste tot). În 1936, *S. Lepkousky* şi *T. H. Yukes* îi atribuie numele de *factor antipelagros al puiului de găină* şi de *factor filtrant al extractelor hepatice*. Acţiunea acidului pantotenic în prevenirea şi tratarea dermatitei pelagroase la puiul de găină a fost confirmată şi de *D. W. Wooley*, *C. A. Elvehjem* şi colab. în 1934 şi 1938. În 1938, *R. J. Williams* şi colab. au reuşit să stabilească structura acidului pantotenic, iar în 1939 *T. H. Jukes* şi *D. W. Wooley* reuşesc să stabilească în mod independent identitatea structurală dintre acidul pantotenic şi factorul antidermatitic al puilor de găină. În 1940 se realizează sinteza totală a acidului pantotenic de mai multe grupe de cercetători (*R. J. Williams* şi *R. Major*, *E. T. Stiller* şi colab., *T. Reichstein* şi *A. Grüssner*, *R. Kuhn* şi *H. Wieland*), care au lucrat independent unele de altele.

În 1947, *F. A. Lipmann* şi colab., *N. O. Kaplan* şi colab., descoperă prezenţa acidului pantotenic în componenta coenzimei A, descoperită anterior, cu doi ani mai devreme de *F. A. Lipmann* şi colab. Descoperirea coenzimei A şi stabilirea rolului său biochimic a contribuit în mod substanţial la dezvoltarea biochimiei moderne (*F. Lynenn* şi colab. 1951, 1960, 1967). *F. A. Lipmann* şi colab. au constatat că preparatele de coenzimă A obţinute din ficat şi din culturile de *Streptomyces fradiae*, conţin între 11—15% acid pantotenic, iar conţinutul total al său împreună cu cel al coenzimei A variază între 22—26%.

În 1953, *J. Baddiely* reuşeşte să stabilească structura integrală a coenzimei A. În acelaşi an *F. A. Lipmann* primeşte Premiul Nobel împreună cu *E. G. Krebs* pentru cercetările lor privind rolul metabolic al coenzimei A.

În 1954, *W. B. Bean* şi *R. E. Hodges* prezintă rolul important al acidului pantotenic în nutriţia umană şi determină simptomele care apar în carenţă de acid pantotenic, prin administrare de antivitamine (derivaţi metilici ai acidului pantotenic).

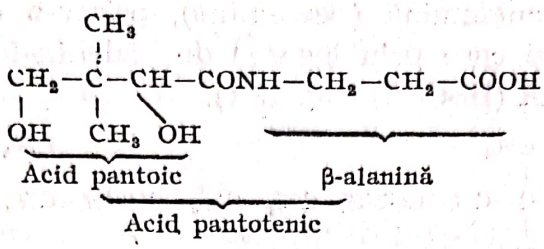
În 1965, *Pugh* şi *Wakil* reuşesc să identifice proteina transportoare de acil (acyl carrier protein), ca o viitoare formă activă a acidului pantotenic. *Fry* face în 1976 o descriere aprofundată a simptomelor care apar la oameni în carenţă de acid pantotenic, fără să utilizeze compuşi cu acţiune antagonică.

13.2. STRUCTURA MOLECULARĂ

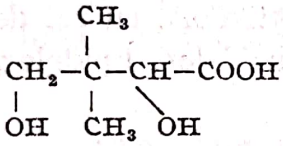
Acidul pantotenic are formula moleculară $C_9H_{17}O_5N$ şi masa moleculară 219,2. În molecula acidului pantotenic s-a pus în evidenţă o grupare carboxil, prin esterificare, două grupări hidroxil libere, iar

Scanned with OKEN Scanner

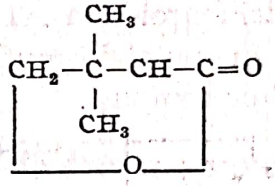
prin hidroliză s-a pus în evidenţă încă un atom de oxigen şi unul de azot. Pe baza cercetării structurii moleculare s-a stabilit că acidul pantotenic este alcătuit din acidul α, γ-dihidroxi-β,β'-dimetil-butiric numit şi acid pantoic, legat peptidic de β-alanină.



Acidul pantoic şi β-alanina s-au pus în evidenţă în stare liberă prin hidroliza acidului pantoteic în mediu alcalin. Acidul pantoic se găseşte în soluţie preponderent sub forma lactonei sale corespunzătoare:



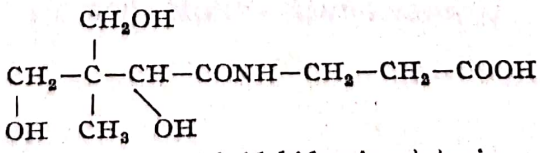
Acid pantoic



α-hidroxi-β,β'-dimetil-γ-butirolactonă

Înlocuirea β-alaninei din structura acidului pantotenic cu un alt aminoacid (acid aspartic, lizină, ornitină, α-alanină, acid glutamic etc.) determină formarea unor compuşi fără activitate vitaminică. Specificitatea de acţiune biologică a acidului pantoteic este strâns dependentă de structura sa moleculară. Mici modificări structurale îi modifică sau înlătură activitatea. Numai forma dextrogiră a acidului pantotenic este biologic activă. Izomerul optic levogir este inactiv la şobolani şi bacterii. Esterificarea grupării carboxilice (care provine de la β-alanină) cu radicali metili sau etili, determină o scădere a activităţii biochimice. Acetilarea acidului pantotenic are ca urmare distrugerea activităţii sale biologice la bacterii şi puii de găină.

Dintre compuşii cu structură similară cu cea a acidului pantotenic, dar cu activitate biologică mult redusă (1,5—25%) face parte şi acidul hidroxipantotenic.

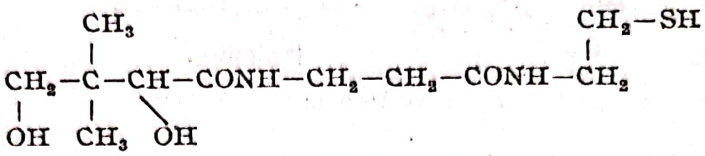


Acid hidroxipantotenic

Dintre derivaţii simpli ai acidului D-pantotenic (acetat, benzoat difosfat, etilmonoacetilpantotenat, etilpantotenat etc.) sunt activi asupra şobolanilor, dar inactivi asupra microorganismelor care nu pot sintetiza acidul pantotenic. Se presupune că şobolanii şi unele mamifere sunt capabile să transforme aceşti derivaţi în forma vitaminică liberă. Mulţi

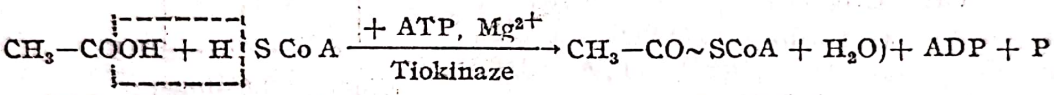
derivați ai acidului pantotenic obținut prin metilare sau hidroxilare a radicalului butiril sunt inactivi sub aspect biologic. Unii derivați pantoil-aminoacizi au activitate inhibitoare asupra microorganismelor.

Prin legarea acidului pantotenic la nivelul grupării carboxilice a β-alaninei, cu tioetanolamină (cisteamină), printr-o legătură peptidică, se obține *panteteină* care prin legarea de adenin-fosforibozo-pirofosfat formează coenzima A (HSCoA) (fig. 13.1).



Panteteină

HSCoA este coenzima acilazelor, care au menirea de activare și transport a acizilor grași. Prin combinarea HSCoA cu acidul acetic sub acțiunea tiokinazei și a ATP, se formează acetil-CoA, cu rol deosebit de important în metabolismul intermediar al glucidelor, lipidelor, protidelor și al altor compuși.



Acid acetic — Acetil CoA

Analogii structurali ai HSCoA, la care acidul pantoic se înlocuiește cu acizii dihidroxivalerianic, dihidroxicapronic, dihidroximonometilbutiric etc., au activitate biochimică mult mai redusă.

Pantotenolul, alcoolul corespunzător acidului pantotenic, este activ la animale, dar se comportă ca inhibitor la unele microorganisme *(Leuconostoc mesenteroides)*.

Pantotenolul este singurul derivat care are aceeași eficiență ca și acidul pantotenic în încărunțirea blănii la șobolanii negri. La animalele homeoterme, pantotenolul se transformă în acid pantotenic și în coenzima A în ficat și în diferite țesuturi.

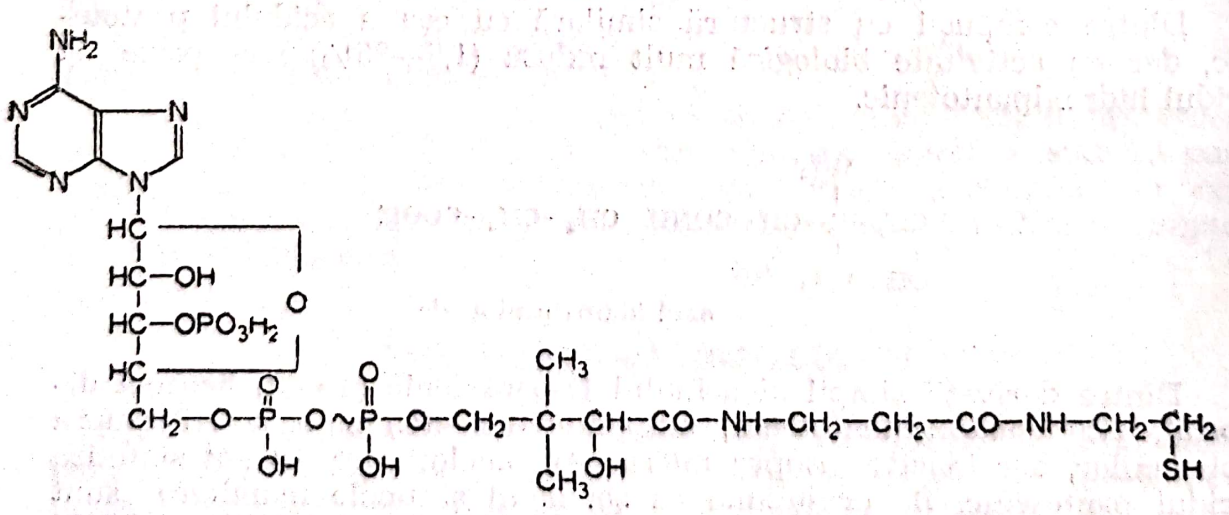
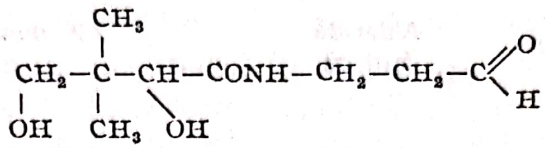


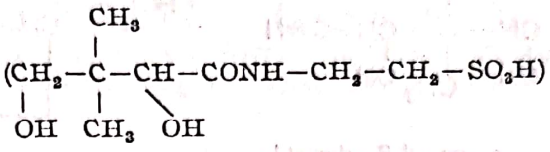
Fig. 13.1. Structura coenzimei A

Pantenalul (aldehida acidului pantotenic) are un uşor efect stimulator asupra creşterii la *Lactobacillus casei,* dar numai asupra animalelor de laborator.



Pantotenal

Pantoiltaurina



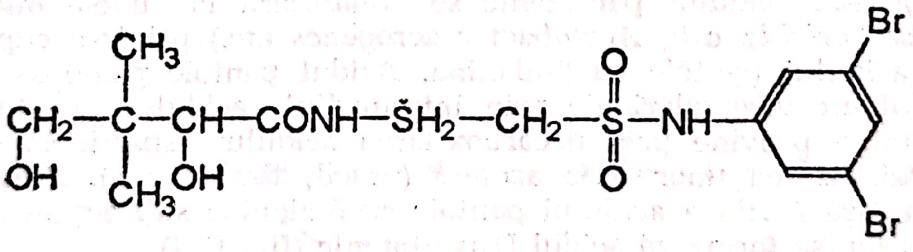
este o antivitamină, iar anilidele sale halogenate (dibromanilin-pantoiltaurina) au efecte antimalarice. Fenilpantotenona şi totilpantotenona se pot utiliza în terapia malariei. Ele micşorează conţinutul acidului pantotenic şi inhibă încorporarea sa în HSCoA la bacterii (fig. 13.2).

13.3. OBŢINERE, SINTEZĂ, BIOGENEZĂ

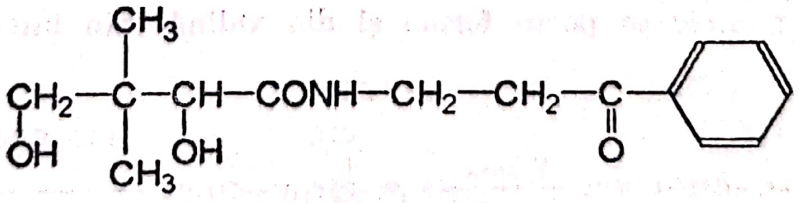
Acidul pantotenic se obţine pe cale industrială din extractul hepatic, din drojdii, ciuperci, bacterii, tărâţele cerealelor etc., care sunt ulterior purificate prin metode cromatografice.

Tot industrial, acidul pantotenic se obţine prin încălzirea lactonei sale cu sarea de sodiu a β-alaninei.

Majoritatea metodelor de sinteză se bazează pe obţinerea pantotenlactonei, sau a sărurilor acidului pantoteic şi a β-alaninei, care ulte-



Pantoil - taurin - dibromoanilină



Fenilpantotenonă

Fig. 13.2. Structura unor derivaţi pantotenici

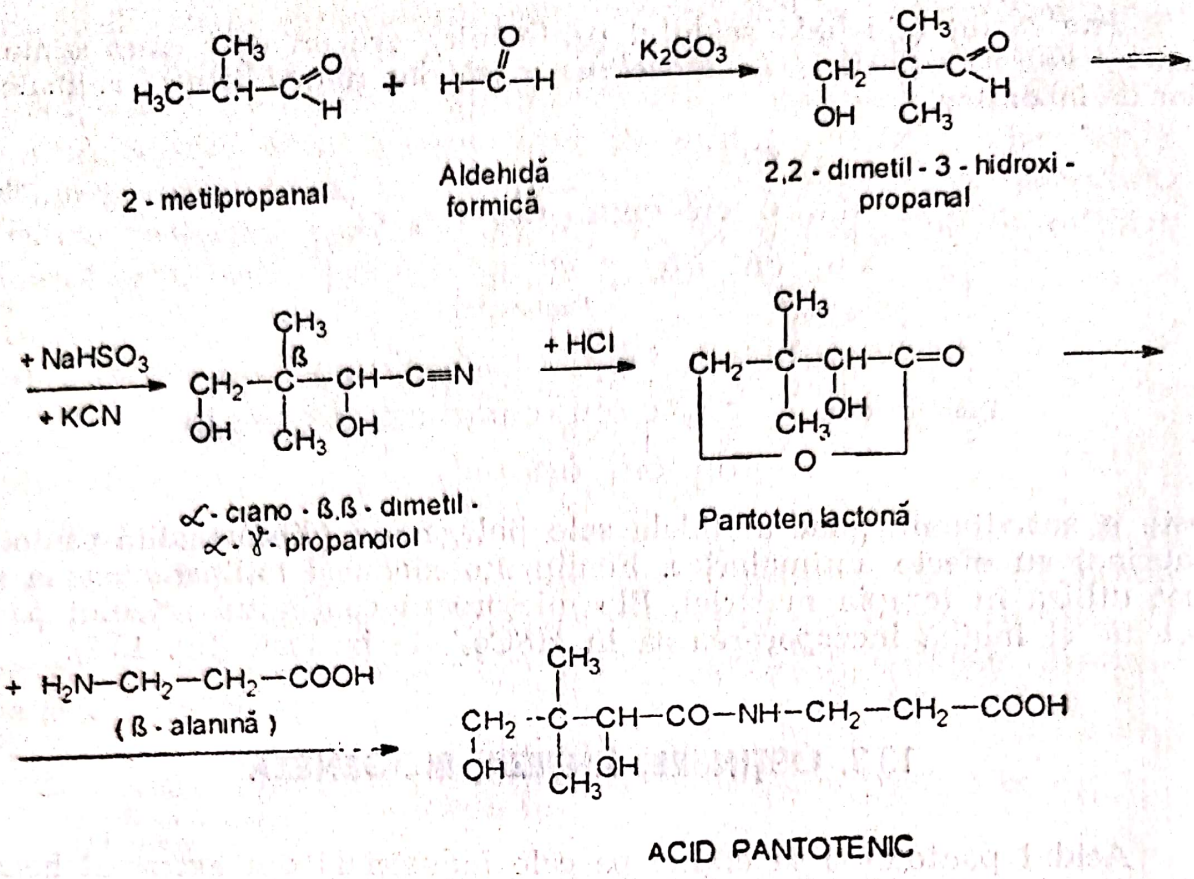


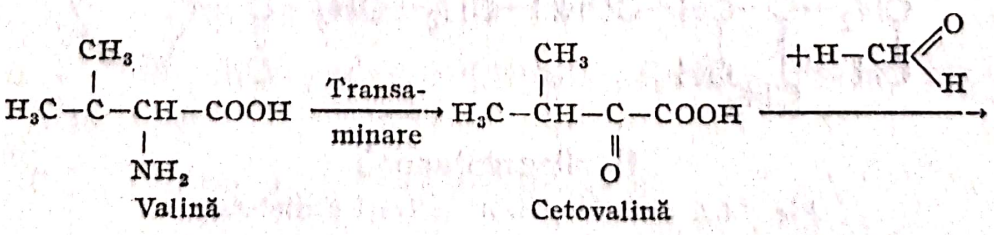
Fig. 13.3. Schema sintezei acidului pantotenic

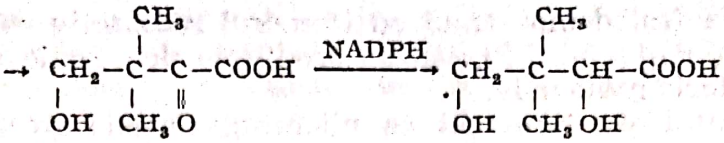
rior sunt utilizate pentru sinteza completă a acidului pantotenic. Schema sintezei acidului pantotenic din 2-metil-propanol și aldehidă formică se prezintă în figura 13.3. Există fără îndoială și alte metode de sinteză a acidului pantotenic, dar am prezentat-o pe cea mai cunoscută și mai ușor de realizat.

Biogeneza acidului pantotenic se realizează la unele microorganisme (*Escherichia coli, Acetobacter aerogenes* etc.) printr-o cuplare directă a acidului pantoic cu β-alanina. Acidul pantoic poate să provină din acidul α-cetoizovalerianic prin intermediul acidului α-cetopantoic, iar β-alanina provine prin decarboxilarea acidului aspartic la C-1 sau din metabolizarea unor baze azotate (uracil, timină etc.). Prin combinarea în fază finală a acidului pantoic cu β-alanina sub acțiunea pantotensintetazei, se formează acidul D-pantotenic (fig. 13.4).

Trecerea acidului α-cetoizovalerianic în acid α-cetopantoic se realizează printr-o reacție de hidroximetilare, care necesită prezența acidului folinic, iar decarboxilarea acidului aspartic necesită prezența piridoxalfosfatului (PALP).

Acidul pantoic se poate forma și din valină prin intermediul cetovalinei.





Acid α-cetopantoic — Acid pantoic

Biogeneza acidului pantotenic se realizează cu consum de energie, fiind necesară prezența în mediu a ATP, Mg^{2+}, Mn^{2+}, K^+ sau NH_4^+.

Unii cercetători susțin că acidul pantoic reacționează în prima fază cu ATP și cu enzima formând un complex E-pantoiladenina, cu eliberare de acid pirofosforic (P-P). În faza a doua complexul E-pantoiladenilat va reacționa cu β-alanina și va forma acidul pantotenic, cu eliberarea enzimei și a AMP-ului. Necesitatea ATP-ului în acest proces

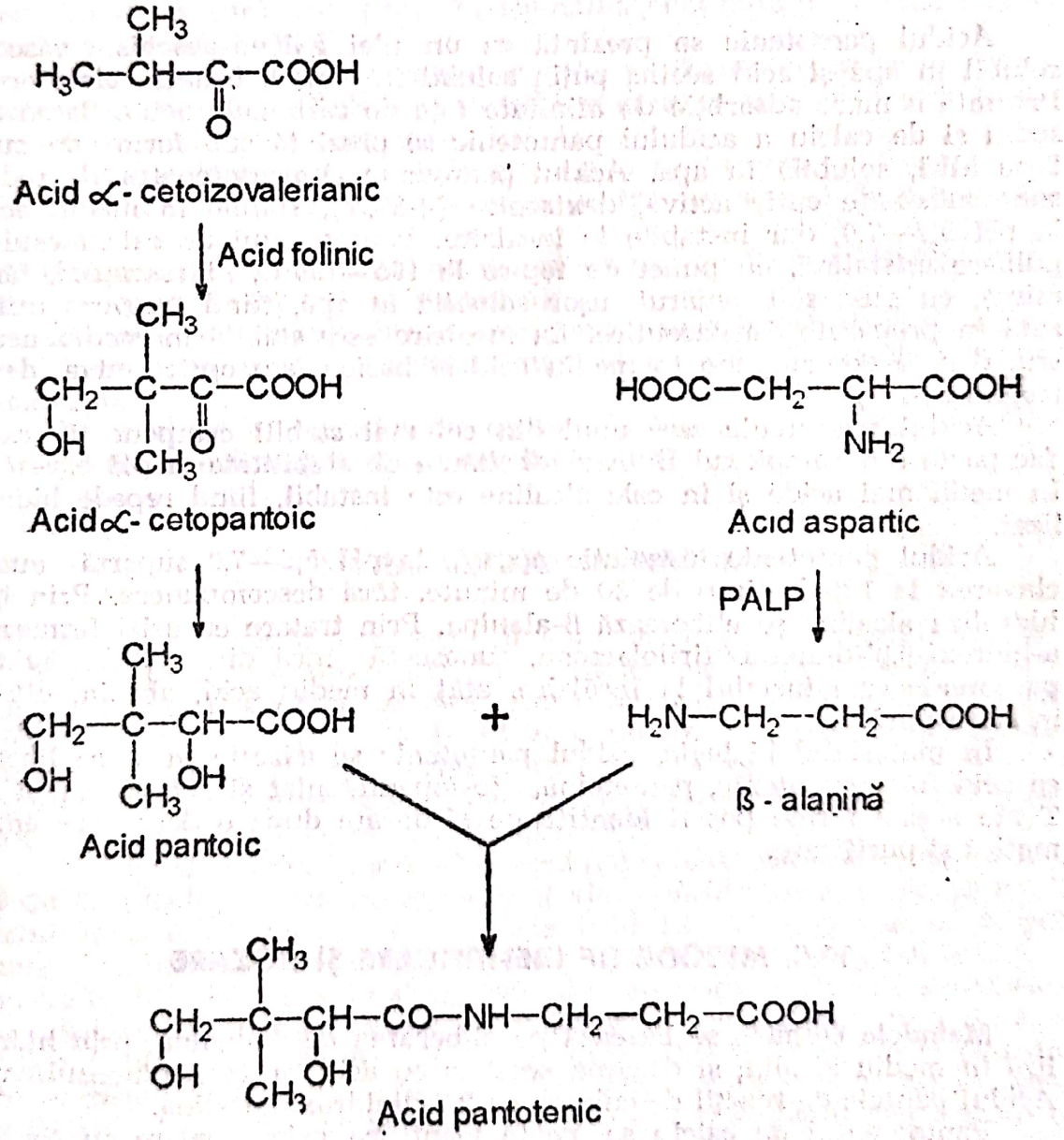


Fig. 13.4. Schema biogenezei acidului pantotenic

de biogeneză a fost demonstrată cu izomerul radioactiv ^{32}P, cu care s-a marcat ATP (la nivelul PP), iar în produsele de reacție s-a identificat acidul pirofosforic radioactiv.

Experimental s-a remarcat că microorganismele *Acetobacter aerogenes, Serattia marcescens, Clostridium butylicum, Proteus vulgaris, Pseudomonas fluorescens, P. aeruginosa, Escherichia coli* etc. biosintetizează acidul pantotenic cu o viteză de 5—35 molecule/celulă/secundă.

Există numeroase dovezi că acidul pantotenic este biosintetizat și de flora intestinală a omului și a animalelor. În prestomacele ierbivorelor, în intestinul gros și în lapte, cantitatea acidului pantotenic este de 20—30 de ori mai mare decât în furaje.

13.4. PROPRIETĂȚI

Acidul pantotenic se prezintă ca un ulei galben-deschis, vâscos, solubil în apă și acid acetic, puțin solubil în etanol, benzen, cloroform. Prezintă o mare adsorbție de afinitate față de cărbunele activ. Sarea de sodiu și de calciu a acidului pantotenic se prezintă sub formă de pulbere albă, solubilă în apă. Acidul pantotenic și pantotenatul de sodiu sunt substanțe optic active, dextrogire (+37,5°), stabile în mediu acid la pH 5,5—7,0, dar instabile la încălzire. Pantotenatul de calciu este o pulbere cristalină, cu punct de topire la 195—196°C, higroscopică, fără miros, cu gust slab amărui, ușor solubilă în apă, fiind frecvent utilizată în preparate farmaceutice. La încălzire este stabilă în mediu neutru, dar se descompune în mediu acid și bazic. Este optic activă, dextrogită (+27°).

Acidul pantotenic este unul din cei mai stabili componenți care fac parte din complexul B. Are maximum de stabilitate la pH 5,5—7,0. În medii mai acide și în cele alcaline este instabil, fiind repede hidrolizat.

Acidul pantotenic în soluție apoasă, la pH 5,5—7,0 suportă autoclavarea la 120°C, timp de 30 de minute, fără descompunere. Prin hidroliza alcalină se eliberează ß-alanina. Prin tratare cu acizi formează α-hidroxi-β,β'-dimetilbutirilolactona, cunoscută încă din 1904. Acidul pantotenic este instabil la încălzire, atât în mediu acid, alcalin, cât și în stare pură.

În materialul biologic, acidul pantotenic se găsește în stare liberă, ca acid fosfopantotenic, panteteină, fosfopantoteniat și de coenzimă A. Toate aceste forme pot fi identificate și dozate după o degradare enzimatică și purificare.

13.5. METODE DE IDENTIFICARE ȘI DOZARE

Metodele chimice se bazează pe eliberarea de β-alanină, prin hidroliză în mediu alcalin, și dozarea acesteia cu acid β-naftochinonsulfonic. Acidul pantoic dă reacții de culoare cu 2,7-dihidroxinaftalina.

Pantotenatul de calciu se poate identifica prin tratare cu NaOH, filtrare și adăugare de $CuSO_4$. Apare o culoare albastră intensă, care se

Scanned with OKEN Scanner

poate colorimetra. De asemenea, prin tratare cu NaOH la cald, răcire și tratare cu HCl, $FeCl_2$ se obține o culoare galben intensă.

Pentru determinări cantitative se recomandă dozarea complexometrică a calciului.

Metodele biologice folosesc pentru teste animale (șobolani, pui de găină, șoareci etc.) la care s-a provocat în prealabil o carență de acid pantotenic, prin utilizare de antivitamine. Se determină apoi cantitatea de acid pantotenic necesară pentru îndepărtarea stării carențiale. La puiul de găină se determină cantitatea de acid pantotenic necesară creșterii și vindecării dermatozei caracteristice apărută în avitaminoză pantotenică.

Metodele microbiologice folosesc ca test *Lactobacillus arabinosus*, *Escherichia coli*, *Acetobacter suboxidans*, *Proteus morgani*, la care se măsoară gradul de stimulare a creșterii, prin determinarea turbidității mediului de cultură, sau prin determinarea conținutului acidului lactic, produs în 48 ore la 34°C.

Acidul pantotenic se testează și prin inhibarea creșterii la *Leuconostoc mesenteroides*. Există și metode enzimatice care se referă la dozarea coenzimei A și a acetilcoenzimei A.

O unitate internațională (UI) este egală cu 14 μg de acid pantotenic și corespunde cantității necesare pe zi pentru prevenirea dermatitei puiului de găină.

Unitatea de coenzimă acetilantă este egală cu 2,42 μg HSCoA pură, cu un conținut de 0,7 μg acid pantotenic.

Unitatea *Stereptobacterium* este cantitatea minimă de acid pantotenic care determină o creștere maximă a speciei *Streptobacterium plantarum*.

Un gram de acid pantotenic conține 71 000 unități de pui de găină și respectiv 50 000 unități de *Streptobacterium*.

13.6. RĂSPÂNDIRE ÎN NATURĂ

Acidul pantotenic se găsește în toate organismele vegetale și animale (pas pantos — peste tot). În cantitate mai mare se află în lăptișorul de matcă, drojdia de bere, făina de fasole, soia, arahide, conopidă, migdale etc., în medie 4—40 μg/g s.u. În plantele furajere conținutul acidului pantotenic variază între 10—25 μg/g. În lăptișorul de matcă se găsește între 150—500 μg/g, iar în produsele horticole conținutul variază între 0,3—20 μg/g (tabelul 13.1).

În regnul animal conținutul acidului pantotenic este mai ridicat decât la plante, având un conținut mediu cuprins între 8—60 μg/g. Ficatul conține 25—60 μ/g s.u., iar rinichiul 32—49 μg/g s.u. În sângele uman, concentrația de acid pantotenic este de 18—34 μg/100 ml, cu o medie la diferite specii de 20 μg/100 ml, care scade în strările de carență.

Acidul pantotenic s-a pus în evidență în cantități mai mari decât în sânge, în glandele suprarenale, inimă, splină, creier, pancreas și plămâni. Se extrage din extracte hepatice hidrolizate, separare pe coloane cromatografice cu cărbune activ la pH 3,0 și eluție ulterioară. Din 250 kg de ficat se extrag aproximativ 3 g de acid pantotenic.

Scanned with OKEN Scanner

Tabelul 13.1

Conținutul în acid pantotenic al unor produse alimentare în μg/g s.u

Produs	Conținut (μg/g s.u.)
Drojdie de bere	200
Tărâțe de grâu	24
Mazăre boabe uscate	21
Ovăz bob întreg	11
Germen de grâu	8,5
Ouă	8,48
Grâu bob întreg	5,1
Mazăre boabe proaspete	7,0
Pâine ntegrală	5,7
Pâine albă	4,6
Mușch de porc	4,7—11
Șuncă	3,4— 6
Cartofi	3,2— 6,5
Brânză	1,3— 9,6
Porumb	3,1
Lapte de vacă	2,9
Făină de grâu	3,0
Portocale	3,4
Mere	0,6
Spanac	1,8
Morcov	2,5
Roșii	3,7

La plantele verzi, acidul pantotenic apare după dezvoltarea lor fotosintetică, fiind corelată formarea sa cu procesul de fotosinteză. Acidul pantotenic este biosintetizat de numeroase ciuperci și bacterii.

Aportul alimentar al acidului pantotenic este obligatoriu pentru animalele care nu îl pot biosintetiza prin flora intestinală sau cea din prestomacele ierbivorelor. La om și la animalele rumegătoare, cantitatea de acid pantotenic biosintetizat de flora intestinală acoperă necesitățile organismelor, fapt pentru care nu se manifestă simptomatologia avitaminozei. La șobolan cantitatea de acid pantotenic biosintetizată în tubul digestiv nu acoperă necesitățile organismului.

În cantitate mai mare, atât la plante cât și la animale, acidul pantotenic se află sub formă de coenzimă A, sub formă de complexe proteice și mai puțin în stare liberă sau sub forme fosforilate. Alimentele preparate au un conținut mai redus de acid pantotenic decât sursele primare datorită pierderilor care se produc în timpul proceselor tehnologice și culinare de obținere a hranei.

Pasteurizarea laptelui cauzează pierderi minore de acid pantotenic dar în timpul pierderii și prăjirii alimentelor la temperaturi mai înalte, pierderile pot fi de peste 50%.

13.7. ABSORBȚIE, EXCREȚIE ȘI NECESITĂȚI

Absorbție. Acidul pantotenic administrat oral este absorbit complet, în special în intestinul subțire, dar există dovezi că o mică cantitate se absoarbe și din stomac. Acidul pantotenic inclus în coenzima A sau în

Scanned with OKEN Scanner

unele complexe proteice este pus în libertate înainte de absorbție, de către enzimele digestive. Procesul de absorbție se bazează mai ales pe difuzie pasivă. Prin același mecanism se absoarbe și pantotenolul care este apoi oxidat în acid pantotenic. Absorbția este stimulată de prezența vitaminelor PP, B_1 și B_2. După absorbție acidul pantotenic este răspândit prin curentul sanguin în tot corpul. Cea mai mare cantitate din acidul pantotenic absorbit se transformă în coeziunea A, o parte se leagă de proteinele transportatoore, iar o parte mai mică rămâne în stare liberă. Concentrația acidului pantotenic variază în diferite țesuturi între 200 și 4500 µg/100 g țesut proaspăt. Fiind un constituent al coenzimei A, acidul pantotenic se găsește în toate țesuturile și celulele organismelor, având cea mai mare concentrație în ficat, glandele suprarenale, rinichi, inimă. În eritrocite, acidul pantotenic se găsește sub formă de coenzimă A, iar în plasmă legat de proteine transportoare, formă sub care circulă prin organism și sub formă liberă. Conținutul total al acidului pantotenic din sânge la adulți variază între 20—200 µg/100 ml, în medie 50 µg/100 ml acid pantotenic, din care 3 µg/100 ml se găsește în stare liberă. Ficatul conține aproximativ 30 mg, majoritatea sub formă de coenzimă A.

Excreție. Eliminarea acidului pantotenic din organism se face în cea mai mare parte prin urină în stare liberă, sub formă de lactonă sau alți compuși. Între cantitatea de acid pantotenic ingerată și cea eliminată există o corelație directă. Omul adult elimină între 2,5—5 mg/24 ore, iar copiii între 2—3 mg/zi. Dacă se administrează pantotenat de calciu pe cale orală, acesta se elimină după 4 ore prin urină, în proporție de 10%. Dacă aceeași cantitate se administrează intravenos, după 4 ore se elimină prin urină 60%. Există dovezi că acidul pantotenic nu se degradează în organism. Din cantitatea de acid pantotenic ingerată, apromixativ 70% se elimină prin urină, iar restul prin fecale, bilă, transpirație. În perioada lactației, o parte din acidul pantotenic ingerat se găsește în lapte.

Necesități. Pentru omul adult necesitățile zilnice în acid pantotenic se apreciază a fi de 10 mg/2500 Kcal, respectiv între 8—12 mg/zi. La păsări necesitățile sunt de 1,1 mg/100 g hrană, la șobolan 0,01 mg/zi, la șoarece 0,03 mg/zi, la câine 0,1 mg/kg greutate corp/zi, la porc 0,2 mg/kg greutate corp/zi, puiul de găină 1,4 mg/zi.

Acidul pantotenic în forma liberă se găsește în cea mai mare parte în plasma sângelui, pe când în celulele țesuturilor se găsește predominant sub formă de coenzimă A. În alimente de asemenea se găsește în cantitate mai mare sub formă legată. Papaina desface acidul pantotenic legat de proteine.

Acidul pantotenic este necesar pentru creștere la șoarece, câine, păsări, insecte, moluște, viermi etc., precum și la numeroase microorganisme, drojdii, ciuperci etc.

Necesitățile organismului uman sunt acoperite prin aport alimentar și prin biosinteza acestuia de către flora intestinală, astfel încât avitaminoza umană apare ca o stare de excepție. Ea se poate obține pe cale experimentală, prin utilizarea de antivitamine.

Scanned with OKEN Scanner

13.8. ROL ȘI ACTIVITATE BIOCHIMICĂ

Forma activă a acidului pantotenic o reprezintă coenzima A (fig. 13.1), numită și coenzima de acetilare, care are un rol esențial în metabolismul lipidelor, glucidelor, protidelor, în biosinteza sterolilor, a hormonilor steroidici, în funcționarea sistemului nervos și a aparatului imunitar.

Acidul pantotenic sub formă de coenzimă acetilată ($CH_3—CO\sim SCoA$) îndeplinește un rol fundamental în transferul grupărilor „$—CO—CH_3$" (C_2 activ) precum și a altor radicali acizi („acil") proveniți de la acizii grași, acidul succinic, aminoacizi etc. Prin legarea HSCoA de un acid sau de un alt compus se formează o legătură macroergică ($CoA—S\sim CO—CH_3$), care prin desfacere eliberează 7,38 Kcal la pH 7,0 ($\Delta G = -7{,}38$ Kcal). $CH_3—CO\sim S—CoA$ (acetilcoenzima A) participă în reacțiile de „transacilare", în procesele de formare a acetilcolinei, acidului hipuric, acetil aminoacizilor etc.

Un rol fundamental îl are acetilcoenzima A în biosinteza și degradarea acizilor grași, a sterolilor, acizilor biliari, a numeroase substanțe terpenice, carotenoide, în ciclu Krebs, în formarea sfingozinei etc. Ia parte și în procese de reducere, în transformarea acizilor în aldehide, în formarea plasmogenului. Prin gruparea $—CH_3$, acetil-coenzima A ia parte la numeroase reacții de adiție, în biosinteza malonil-CoA, a acizilor acetil-acetic, citric, β-hidroxi-β-metil-glutaric, fiind inclusă în numeroase sisteme enzimatice.

In structura coenzimei A se deosebesc două părți însemnate: *acidul adenilic* și *panteteina*, legate între ele prin intermediul *acidului pirofosforic*. Biosinteza coenzimei A se poate realiza prin următoarele reacții:

$$\text{Acid pantotenic} \xrightarrow[\text{ATP}\uparrow]{\text{ADP}} \text{Acid 4'-fosfopantotenic} \xrightarrow[\text{CTP (sau ATP)}]{\text{Cisteină}}$$

$$\text{4'-fosfopantetenilcisteină} \xrightarrow[-CO_5]{} \text{4'-fosfopanteteină} \xrightarrow[-P—P]{+ATP}$$

$$\text{defosfocoenzima A} \xrightarrow[\text{ATP}\uparrow]{\text{ADP}} \text{Coenzima A}$$

Enzimele care iau parte în procesul de biosinteză a coenzimei A au fost izolate din culturile de *Neurospora crassa, Escherichia coli, Proteus morganis, Lactobacillus arrabinosus, L. helveticus* etc.

Biosinteza de 4'-fosfopantotenilcisteina din acidul 4'-fosfopantotenic și cisteină necesită prezența CTP (acid citidintrifosforic), care poate fi înlocuit în experiențe „in vitro" cu ATP.

Panteteina este un derivat de cisteamină (tioetanolamină) al acidului pantotenic. Prezența cisteinei în componența coenzimei A (prin intermediul panteteinei) îi conferă proprietăți speciale, datorită grupării — SH libere. Prin această grupare, coenzima A participă în numeroase procese metabolice, inclusiv în activarea acizilor grași și a altor acizi (acetic, succinic, malonic etc.). Activarea acizilor grași sub formă de acilcoenzimă

Scanned with OKEN Scanner

A se face în prezența ATP, Mg^{2+}, K^+ și a tiokinazelor, cu formarea unei legături macroergice.

$$\underbrace{R-COOH}_{\text{Acid gras}} + HS-CoA \xrightarrow[ATP,\ Mg^{2+},\ K^+]{\text{Tiokniaze}} \underbrace{R-CO\sim S-CoA}_{\text{Acil-CoA}} + H_2O + AMP + PP$$

Coenzima A

Prin decarboxilarea oxidativă a acizilor piruvic și α-cetoglutaric, în prezența HS-CoA se formează acetil-CoA și respectiv succinil-CoA. Anemia provocată de insuficiență pantotenică se datorește imposibilității de formare a succinil-CoA, care participă la sinteza hemului.

Radicalii acetil activați din acetil--CoA pot fi transferați pe diferiți aminoacizi, arilamine, glucide, colină etc. Acizii grași saturați sunt în general compuși inactivi din punct de vedere chimic. Prin transformarea lor în acilcoenzime A, ei devin activi și suferă diferite procese de metabolizare. HSCoA intervine în procesul de scindare tiolică a β-cetoacil-CoA, care rezultă în procesul de degradare a acizilor grași, a sterolilor, terpenelor etc., cu formare de acetil-CoA și acil-CoA ce conține cu doi atomi de carbon mai puțin față de sursa inițială (acid gras, sterol, terpenă, alcool superior). În deficiență de acetil-CoA se produce o insuficiență a glandelor suprarenale și o diminuare accentuată a biosintezei sterolilor, hormonilor steroidici, a vitaminelor D și a acizilor biliari, fapt ce demonstrează că „acetatul activ" este un precursor al acestor substanțe. Acidul pantotenic este unul din constituenții sistemului multienzimatic de biosinteză a acizilor grași.

Datorită faptului că acidul pantotenic, sub formă de HSCoA, ia parte în metabolismul lipidelor, glucidelor, protidelor, în biosinteza și degradarea acizilor grași a sterolilor, terpenelor, a hormonilor steroidici, precum și în diferite reacții de acilare și transacilare, denotă rolul major ce-l are această vitamină în metabolismul celular. Simptomele de carență pantotenică sunt o consecință a dereglării proceselor metabolice la care participă coenzima A.

Prin faptul că acidul pantotenic este un component al coenzimei A, are un rol însemnat în procesele de creștere și de energogeneză, ca urmare a metabolizării substanțelor alimentare din hrană, fiind prezent în toate celulele organismului. Țesuturile, mucoasele și părul necesită acid pantotenic pentru creștere, ca și pentru sistemul imunitar de apărare al organismului. Acidul pantotenic este implicat în producerea de anticorpi.

Pantotenolul, forma alcoolică a acidului pantotenic, este un component activ al coenzimei A, care promovează creșterea, funcția și repară țesuturile epiteliale și endoteliale. În experiențe pe șobolani, doze de pantotenol de 25 mg/kg greutate corp, vindecă ulcerul gastric, provocat experimental. Acidul pantotenic se comportă în multe procese ca un antagonist al tiroxinei. Administrarea de acid pantotenic la șobolani mărește procesul de acetilare a acidului p-amino-benzoic dat experimental. Acidul pantotenic se comportă în multe procese ca un antagonist al tiroxinei. Acidul pentotenic este un factor de creștere esențial pentru numeroase microorganisme dintre care menționăm pe *Lactobacillus casei, L. arabinosus, Clostridium tetani, C. welchii, Bacillus brasicae, B. pantothenicus, Bacterium linens, Fuscobacterium nucleatum, Streptococcus haemoliticus, Rhizobium trifolii* etc. Unele microorganisme pot biosintetiza integral acidul pantotenic *(Escherichia coli)*, iar altele numai parțial (stroptococi

Scanned with OKEN Scanner

hemolitici), unele sacharomicete, *Acetobacter suboxidans* etc.). Acidul pantotenic are de asemenea un rol însemnat în formarea substanțelor porfirinice, în biosinteza fosfolipidelor care intră în constituția membranelor celulare, a anticorpilor, a mediatorilor neurochimici (acetilcolina), precum și în formarea substanțelor porfirinice precum și în formarea proteinei purtătoare de acil (ACP), o enzimă ce are un rol fundamental în biosinteza acizilor grași. HSCoA participă la numeroase reacții de activare a metaboliților intermediari inclusiv a acidului acetic care rezultă în urma unor transformări metabolice în acetil-CoA, Aceasta stă la încrucișarea unor căi metabolice, luând parte activă în biosinteza și metabolizarea multor substanțe, în reacții de acetilare și transacetilare, inclusiv în etilarea sulfamidelor, care vor fi excretate prin urină sub formă de acetilsulfamide. Acetilcoenzima A face legătura reversibilă între metabolismul glucidelor și cel al lipidelor, dintre glucide și terpene (steroli, carotenoide etc.), glucide și hormoni steroidici (de creștere, sexuali și stres etc.). HSCoA participă la activitatea valinei, leucemiei, izoleucinei, lizinei și a altor aminoacizi.

Ceilalți derivați ai acidului pantotenic, cum sunt acidul fosfopantotenic, pantoteinatul și fosfopanteteinatul, nu îndeplinesc funcții biochimice însemnate, dacă nu se ia în considerare participarea lor în biosinteza coenzimei A. Panteteina singură constituie un factor de creștere pentru *Lactobacillus bulgaricus* și pentru alte microorganisme. Corelarea dintre deficiența în acid pantotenic și dereglarea proceselor metabolice în care sunt implicate mecanisme de transfer a radicalului acetil s-a pus în evidență în toate țesuturile organismelor.

13.9. HIPOVITAMINOZE ȘI HIPERVITAMINOZE

Avitaminoza pantotenică la om încă nu s-a pus în evidență. S-a presupus existența hipovitaminozei pantotenice pe baza tratării unor simptome carențiale exclusiv prin tratare cu acid pantotenic.

Nu s-au putut stabili manifestări clinice care să fie atribuite deficienței nutritive a acidului pantotenic, deși s-a remarcat sindromul „picior rănit" la prizonierii de război în anii 1940. Prin administrarea de acid ω-CH_3-pantotenic, care este un antagonic structural (antivitamină) s-a remarcat o slăbire generală, dureri de cap, insomnii, crampe abdominale, vomitări, diaree, dereglări cardiovasculare, dereglarea răspunsului la insulină și histamină. S-au remarcat tulburări dermatozice, digestive, cardiovasculare, respiratorii, renale și ale glandelor endocrine. Apar dureri în membrele inferioare, tahicardie, ficat gras, astenie musculară, ameteli, paralizii, scăderea rezistenței la infecții, convulsii, comă. Scade capacitatea de acetilare, cu consecințe metabolice grave, crește excreția 17-cetosteroizilor și a celorlalte vitamine hidrosolubile.

Primele simptome au apărut la voluntarii hrăniți artificial după 9 săptămâni. Prin administrarea de acid pantotenic se realizează vindecarea afecțiunilor menționate. Alcoolicii au nevoie de cantități mai mari de acid pantotenic deoarece alcoolul interferează utilizarea acidului pantotenic. La fel ca alcoolul se comportă și contraceptivele luate oral. Excreția acidului pantotenic este crescută la diabetici, iar absorbția acestuia poate fi împiedicată de afecțiuni digestive.

Scanned with OKEN Scanner

La om nu se produce o carență naturală absolută în acid pantotenic întrucât, pe de o parte, acidul pantotenic se găsește larg răspândit în produsele vegetale și animale, iar pe de altă parte, flora intestinală biosintetizează o cantitate relativ mare de acid pantotenic, cele două surse acoperă necesitățile organismului. În stări de carență experimentală apar dereglări gastrointestinale (gastrite, enterite), dermice și nervoase. Este posibil ca simptomele carenței în acidul pantotenic să fie însoțite și întărite de simptomele hipovitaminozei altor vitamine din complexul B. Nu s-a pus în evidență o avitaminoză în acid pantotenic singulară la om, ci numai împreună cu alte avitaminoze naturale sau provocate artificial.

La animale, fenomenele produse de deficiența în acid pantotenic, variază de la o specie la alta. Apar leziuni ale pielii la puiul de găină, decolorarea părului sau a blănii la șobolani, alopecie la șoareci etc. Unele simptome ale stării carențiale pot fi vindecate și de alte vitamine din complexul B (biotină, acid folic, inozitol, colină), fapt pentru care unii cercetători nu le consideră suficient de specifice avitaminozei acidului pantotenic.

Puiul de găină este dependent de aportul furajer al acidului pantotenic. În stare carențială se instalează „pelagra puiului de găină", care se manifestă prin hiperkeratinizarea epidermei în jurul ochilor și a ciocului, pe labe, decolorarea penajului, încetarea creșterii, anemie etc. Uneori apar hemoragii subcutanate și la nivelul glandelor suprarenale, scade fertilitatea și producția ouălor, apare ficatul gras, hiperlipemie și hipercolesterolemie, scade accentuat conținutul acidului pantotenic și a coenzimei A din ficat, rinichi, inimă și mușchi.

La șobolani și șoareci, în starea carențială obținută prin folosirea de antivitamine, apar tulburări gastrointestinale, rinită hemoragică, leziuni hepatice, necrozarea glandelor suprarenale, cu scăderea hormonilor steroizi din zona corticală. Apar ulcerații ale limbii, ulcer duodenal, scăderea în greutate, diaree etc.

La câine apare depigmentarea părului, tulburări de ritm cardiac, leziuni hepatice și renale, hipoglicemie și chiar comă. La suine, carența se manifestă printr-un apetit scăzut, lipsa unei coordonări a mișcării, secreții nazale excesive, diaree, alterări ale sistemului neurovegetativ.

La primate în stare carențială se oprește creșterea, apare anemia ataxia, diaree etc.

Hipervitaminoze. Nu s-au semnalat cazuri de hipervitaminoze ale acidului pantotenic întrucât acesta este bine tolerat de om și de animale, administrat chiar în doze mari nu este toxic. Administrarea unor doze mai mari de 10 g de acid pantotenic pe zi, o perioadă îndelungată, determină apariția unor tulburări gastrointestinale minore.

Pantotenatul de calciu, administrat oral, în doze de 10000 mg la șoarece și șobolan, prezintă fenomene de toxicitate (DL_{50}), iar dacă se administrează subcutanant, dozele variază între 2700—3400 mg/kg greutate corp.

Câinele și maimuța suportă o doză de 1 g acid pantotenic/kg greutate corp, fără manifestarea vreunui simptom toxic. Diverse animale de laborator au suportat chiar doze de 10 g/kg greutate corp fără tulburări. Pantotenatul de calciu, administrat 6 luni, în doze de 1 g/zi la maimuță,

Scanned with OKEN Scanner

50 mg/kg greutate corp la câine, 200 mg/kg greutate corp la șobolan, nu a determinat apariția unor simptome de toxicitate, nici o modificare a pulsului, respirației, musculaturii, sistemului nervos, aparatului gastro-intestinal.

13.10. INTERRELAȚII VITAMINICE

Acțiunea acidului pantotenic este strâns corelată cu a celorlalte vitamine din complexul B. S-a observat că la șoarecii supuși unui regim lipsit de acid pantotenic, care conține însă inozitol, conținutul acestuia din țesuturi este mult mai scăzut față de lotul martor, care avea în hrană acid pantotenic. Dacă se administrează șoarecilor carențați acid pantotenic, crește și conținutul inozitolului din țesuturi. Această corelație dintre conținutul acidului pantotenic și cel al inozitolului s-a pus în evidență și la câini, remarcându-se că dereglările care apar în absorbția glucidelor și a proteinelor se datoresc în mare parte lipsei din hrană a acidului pantotenic și parțial a inozitorului.

Acidul pantotenic manifestă acțiuni sinergice în procesele de creștere cu vitamina PP, acidul folic și biotina. Biosinteza acetil-colinei este stimulată de prezența acidului pantotenic. Între acidul pantotenic și vitamina B_2 există o corelație metabolică similară cu cea a inozitolului. Injectarea acidului pantotenic sau a vitaminei B_2 determină creșterea conținutului în sânge și a celeilalte vitamine.

La animalele carențate în tiamină, administrarea de acid pantotenic determină creșterea greutății animalelor. Dacă se administrează tiamină la șobolan, crește conținutul coenzimei A din ficat, rinichi și sânge. Riboflavina stimulează creșterea culturilor de *Lactobacillus leichmanii*, lipsite de acid pantotenic. Atât biotina cât și riboflavina ameliorează decolorarea blanei la șobolanii aflați în carență de acid pantotenic. Între acidul pantotenic și vitamina B_{12} s-a remarcat o relație antagonică. Carența în acid pantotenic determină o creștere a conținutului vitaminei B_{12} la șobolan, în ficat și în diferite țesuturi, iar carența în vitamina B_{12} determină o creștere a conținutului acidului pantotenic și a coenzimei A. Pe de altă parte s-a observat că administrarea vitaminei B_{12} la puii de găină carențați în acid pantotenic agravează simptomele carențiale și scade ritmul de creștere. In carența acidului pantotenic se constată o creștere a excreției cutanante a porfirinelor, apariția unei colorații roșii a pielii, tulburări de gestație etc. Toate aceste dereglări se vindecă prin administrarea de vitamină C. În carența de vitamină C, tratamentul cu acid pantotenic determină o vindecare a animalelor carențate, fapt ce reflectă existența unei corelații sinergice și între vitamina C și acidul pantotenic. În carență de acid pantotenic se produce la șobolan alterarea glandelor suprarenale, fapt ce influențează negativ biosinteza hormonilor corticosuprarenali, datorită reducerii procesului de acetilare. Diminuarea procesului de acetilare determină insuficiența glandelor suprarenale.

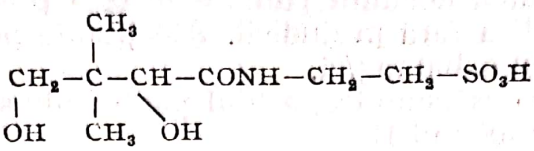
Numeroase cercetări au confirmat că vitamina B_{12} ajută transformarea acidului pantotenic liber în coenzima A. În absența vitaminei B_{12} formarea coenzimei A descrește și este diminuat metabolismul lipidelor.

Acțiunea acidului pantotenic este mai eficientă în prezența vitaminelor A, B_1, B_2, B_6, PP, biotinei, acidului folic.

Scanned with OKEN Scanner

13.11. ANTIVITAMINE

Dintre antagoniștii structurali cu acțiune antivitaminică mai importanți sunt pantoiltaurina



și acidul ω-CH_3-pantotenic, care inhibă acidul pantotenic în procesele de acetilare la om și la animale.

Pantoiltaurina și acidul ω-metil-pantotenic inhibă efectul coenzimei A, cu scăderea conținutului său în ficat și cu acțiuni de reducere a hiperlipemiei, hipercolesterolemei, hiperglicemiei, glicozuriei, cetonouremiei, cetonuriei și respectiv creșterii gluconeogenezei stimulată de hormonii corticosuprarenali în diabet. Asemenea antagoniști structurali, alături de sulfamidele antidiabetice se folosesc în terapia diabetului uman. Dar din cauză că pantoiltaurina și acidul ω-metil-pantotenic produc la om reacții secundare nedorite și adverse, cum sunt anemie, scăderea conținutului vitaminei C, creșterea piruvicemiei, s-a oprit utilizarea lor în clinica umană. Pantoiltaurina se folosește pentru combaterea la animale a unor paraziți, care necesită pentru creșterea lor, acid pantotenic. Derivații metoxilați în pozițiile α- și β- au de asemenea o acțiune antagonistă acidului pantotenic.

Pantoiltaurina conține în locul β-alaninei, taurina. Inhibă creșterea a numeroase microorganisme și numeroase procese metabolice.

Dintre antagoniștii nonanalogi ai acidului pantotenic, fac parte salicilații și derivații lor (salolul), acidul malonic, acidul 2-clor-4-aminobenzoic, streptomicina etc., a căror efect de inhibiție asupra creșterii unor microorganisme este înlăturat prin administrarea de acid pantotenic.

La șobolanii cu diabet aloxanic, apare o creștere semnificativă a acidului pantotenic, acetil-CoA, coenzimei A în ficat.

Alcoolul determină o descreștere a acidului pantotenic în țesuturi, dar nu și la nivelul serului. Utilizarea eficientă a acidului pantotenic este frânată la alcoolici. La animalele cercetate, acidul L-pantotenic are efecte antagoniste. Derivații metil-bromurați distrug acidul pantotenic din alimente, tubul digestiv, ficat și din alte organe în care este depozitat.

13.12. INDICAȚII TERAPEUTICE ȘI SUBSTANȚE FARMACEUTICE

Pantotenatul de calciu, singur sau în asociere cu unele vitamine B, este folosit în profilaxia avitaminozelor B, în nevrite periferice, crampe musculare ale membrelor inferioare, pentru prevenirea încărunțirii, căderii părului, în cursul graviditătii și în perioada de lactație, în hepatita cronică, în inflamațiile căilor respiratorii (bronșite). Este utilizat cu succes și în tratarea hipertensiunii, anghinei pectorale, ateroscleroză, arsuri, degerături, stomatite, pneumonie, precum și în reducerea efectelor toxice ale salicilaților.

Scanned with OKEN Scanner

Preparatele farmaceutice se administrează în mare parte pe cale orală întrucât absorbția acidului pantotenic se realizează ușor. Pantotenatul de calciu se administrează parental, cu dozarea variabilă, între 10 și 100 mg pe fiolă.

Întrucât toxicitatea acidului pantotenic este practic inexistentă dozele mari se pot utiliza fără prejudicii. Afecțiunile nervoase sunt tratate cu doze mari, în jurul a 100 mg/zi.

În preparatele polivitaminice, acidul pantotenic se găsește asociat cu alte vitamine din complexul B.

Electovit este un produs farmaceutic, complex de vitamine cu adaos de fosfat bazic de calciu, folosit în tratarea anemiilor, a unor boli infecțioase, în stări de convalescență, afecțiuni hepatice, tulburări gastrointestinale, diabet, reumatism, polinevrite, nevralgii etc.

Litrisonul este un preparat farmaceutic folosit în tratarea afecțiunilor hepatice. Se folosește în combaterea hepatitelor, ficatului gras, afecțiuni infecțioase ale ficatului, în alcoolism etc. Se dă sub formă de drajeuri care conțin 30, 60, 300 mg acid pantotenic.

Bepathen este un preparat ce conține mai multe vitamine din complexul B. Acesta stimulează transformarea în corpul omului a pantotenatului în acid pantotenic. Acest preparat este necesar pentru sinteza coenzimei A. Se aplică în tratarea arsurilor solare, iritații ale pielii prin căldură sau radiații, eczemelor, crăparea buzelor, fisuri în piele etc.

Pantetenolul este indicat în tratarea enterocolitelor, inflamația căilor respiratorii, dermatoze, alopecie, cicatrizarea rănilor etc. Este adăugat în diferite preparate cosmetice, pentru menținerea pielii fragede, fără keratinizări și zbârcituri. El stimulează creșterea celulelor și „reface" țesuturile rănilor. Inhibă inflamațiile mucoaselor și înroșirea pielii. Stimulează creșterea părului și inhibă încărunțirea și căderea acestuia. Pantetenolul se folosește cu succes în tratarea bolilor de piele, a mucoaselor, ulcere, bronșite, laringite, arsuri de soare, degerături etc.

Acidul pantotenic și pantotenolul se folosesc în tratamentul rănilor superficiale, în inflamațiile epiteliilor și a mucoaselor, în dermatoze, în stări postoperatorii intestinale. Pentru stimularea peristaltismului intestinal se folosesc doze de 500—1 000 mg intravenos. Pentru tratarea arsurilor și pentru cicatrizări se folosesc soluții sau creme cu pantotenol. Pentru inflamațiile căilor respiratorii se folosesc aerosoli cu pantotenol, iar a celor vaginale cu tampoane ce conțin pantotenol.

Doze orale zilnice de pantotenat de calciu de 1 g pentru maimuță 50 mg/kg greutate corp la câine și 200 mg/kg greutate corp la șobolan au fost tolerate timp de 6 săptămâni fără reacții negative.

Pantotenolul sub formă de tablete, care conțin doze de 300—400 mg substanță activă se folosește în producerea mobilității intestinelor. În tratamentele care stimulează absorbția vitaminelor B și anihilarea acțiunii antivitaminelor sau a unor factori care inhibă absorbția se administrează acid pantotenic intramuscular în doze de 500 mg/zi, câteva săptămâni. Pentru vindecarea paraliziei intestinale se aplică doze de 1000 mg la fiecare 6 ore.

In țările industrializate acidul pantotenic se adaugă în unele produse alimentare și în băuturi nealcoolice pentru îmbunătățirea valorii biologice a acestora, precum și în scopul de prevenire a unor avitaminoze B.

Scanned with OKEN Scanner

Capitolul 14. BIOTINA

14.1. Scurt istoric 347
14.2. Structura moleculară şi analogi structurali 349
14.3. Proprietăţi şi biogeneză. 352
14.4. Metode de identificare şi dozare 353
14.5. Răspândire în natură 354
14.6. Absorbţie, excreţie şi necesităţi 355
14.7. Rol şi activitate biochimică. 356
14.8. Hipovitaminoze şi hipervitaminoze 360
14.9. Interrelaţii vitaminice şi hormonale 361
14.10. Antivitamine 362
14.11. Indicaţii terapeutice şi farmaceutice 363

Biotina este o vitamină importantă pentru om, majoritatea animalelor şi pentru numeroase microorganisme. Ea stimulează creşterea ţesuturilor meristematice prin intensificarea diviziunilor celulare. Se găseşte în stare liberă sau combinată cu proteine, peptide sau chiar cu aminoacizi. În cantitate mai mare se găseşte în gălbenuşul de ou, ficat, drojdii, rinichi, cojile cerealelor etc.

Se cunosc două biotine naturale, α- şi β-biotina. Ambele biotine au o structură biciclică, fiind formate dintr-un nucleu pirimidinic, condensat cu un nucleu tiofenic, de care se leagă acidul valerianic sau izovalerianic.

In decursul timpului biotina a fost denumită *bios II, bios II B, factorul X, factorul W, vitamina 8, vitamina H, coenzima R,* denumiri vechi, scoase din actuala nomenclatură, având doar o semnificaţie istorică. Cu toate că se cunosc opt forme structurale de biotină, numai D-biotina se găseşte larg răspândită în natură şi prezintă activitate vitaminică.

14.1. SCURT ISTORIC

Biotina a fost extrasă prima dată din factorul „Bios", pus în evidenţă în 1901 de, către *E .Wildiers,* ce reprezenta un extract total de drojdii, practic un amestec de substanţe, care stimula creşterea drojdiilor, a unor ciuperci şi a numeroase microorganisme.

Scanned with OKEN Scanner

In perioada anilor 1915—1031 din factorul „Bios" s-a extras un compus denumit Bios I, identificat ulterior ca mezoinozitol, apoi un compus denumit Bios II A, omologat ulterior cu β-alanina, precum și complexul Bios II B, denumit biotină, întrucât semăna cu o substanță cristalină extrasă din gălbenușul de ou.

Denumirea de vitamina H atribuită anterior biotinei, s-a datorat proprietății acesteia de a împiedica intoxicarea animalelor cu ou crud si de a proteja pielea, fiind numită și vitamina de protecție a pielii. Numele de vitamina H provine de la cuvântul „Haut", care în limba germană înseamnă piele.

Denumirea de coenzima R provine de la proprietatea pe care o are biotina, similară cu a unor coenzime respiratorii, de a stimula activarea și transformarea azotului molecular în azot organic, proces care se petrece în rădăcinile plantelor din genul *Rhizobium* și a altor plante leguminoase.

In 1916, *H. Bateman* raportează efectul defavorabil ce se produce la animalele de experiență hrănite cu doze mari de albuș de ou proaspăt. În 1927, *W. Boas,* constată la șobolanii hrăniți cu albuș de ou crud, căderea masivă a părului și apariția dereglărilor dermatitice. Tot acest cercetător menționează că efectele negative produse la șobolan prin consumul de albuș de ou crud, pot fi vindecate dacă în hrana acestora se administrează un factor protectiv extras din ficat, denumit factor X. In 1931, *P. György* extrage factorul X din ficat și îl denumește vitamina H, pentru efectele sale favorabile asupra pielii. În 1933, cercetătorii *Allison, Hoover* și *Burk* (ROCHE, 1994), izolează o coenzimă respiratorie, denumită coenzima R, esențială pentru creșterea speciei *Rhizobium leguminozarum,* pentru activarea și fixarea azotului în rădăcinile plantelor leguminoase. În 1935, *F. Kögl* și *B. Tonnis* extrag un factor de creștere cristalin, din gălbenuș de ou uscat și îi atribuie numele de biotină. În 1940, *P. György, D. B. Malville, P. Burk,* demonstrează că biotina, vitamina H și coenzima R sunt compuși identici. Acești cercetători reușesc izolarea și purificarea biotinei din ficat.

In 1942, *F. Kögl* și grupul său din Europa și *V. du Vigneaut* și col. din S.U.A. reușesc să determine structura moleculară a biotinei extrase din ou și împreună cu *M. Sydnstricker,* demonstrează necesitatea prezenței biotinei în alimentația umană. În 1943, *S. A. Harris, K. Folkers* și colab. reușesc să obțină biotina prin sinteză, iar în 1949 *M. W. Goldberg și L. Sternbach* pe baza unei tehnologii perfecționate, obțin biotina pe cale industrială. *W. Traub,* confirmă în 1956 structura biotinei, prin analiza acesteia cu raze X. În 1959 grupul renumitului cercetător *F. Lynen* descriu funcțiile biologice ale biotinei și rolul acesteia în enzimele carboxilice. Dereglările metabolice care apar în cazul unor deficiențe genetice de carboxilare dependente de biotină au fost prezentate de *D. Gompertz* și colab. în 1971. În 1981, *B. J. Burri* arată că dereglările care apar la copii datorită insuficienței unor carboxilaze se datoresc apariției unor mutații care afectează biosinteza și activitatea carboxilazelor. Aceeași constatare o remarcă și *B. Wolf* în 1983, arătând rolul metabolic important al carboxilazelor în procesul de fixare și transport al dioxidului de carbon.

Scanned with OKEN Scanner

14.2. STRUCTURA MOLECULARĂ ŞI ANALOGI STRUCTURALI

Sub aspect structural se cunosc două biotine naturale, cu activitate vitaminică, numite α- şi respectiv β-biotina. Ele sunt substanţe izomere, au aceeaşi formulă moleculară, $C_{10}H_{16}O_3N_2S$, dar se deosebesc prin punctul de topire, activitatea optică şi structura catenei laterale. Biotina extrasă din ou s-a numit α-biotină, iar cea extrasă din ficat β-biotină.

Ambele biotine au o structură complexă, fiind formate prin condensarea unui heterociclu imidazolic (a), cu un ciclu tiofenic (b), la care se găseşte o catenă laterală de acid valerianic pentru β-biotină şi respectiv acid izovalerianic pentru α-biotină (fig. 14.1). Ambele biotine conţin o grupare carboxilică liberă, un ciclu pirimidinic cu 2 atomi de azot, un ciclu tiofenic cu un atom de sulf, care provin dintr-o legătură tioeterică.

Structura β-biotinei a fost confirmată prin sinteza acesteia, folosind ca substanţe primare L-cisteina şi acidul cloroacetic. β-biotina reprezintă forma structurală principală a biotinei. α-biotină, a cărei formulă structurală a fost stabilită de F. Kögl, are în prezent mai mult un interes istoric. α-biotina nu se obţine prin sinteză. Unele microorganisme o pot însă biosintetiza din acid pimelic ($HOOC-(CH_2)_5-COOH$), cisteină, acid formic şi din alte substanţe primare. Din cei 8 stereoizomeri posibili ai β-biotinei, numai D-biotina este activă biologic şi se găseşte larg răspândită în natură.

Dintre analogii structurali ai biotinei face parte şi *oxibiotina*, care se obţine prin înlocuirea atomului de sulf din ciclul tiofenic cu oxigen. Acest compus păstrează numai 5% din activitatea β-biotinei asupra animalelor şi 25—30% asupra creşterii unor microorganisme. Dacă atomul de sulf este înlocuit cu un atom de nichel se obţine un compus (Ni-biotina), ce stimulează creşterea drojdiilor care îl transformă în biotină, dar este inactiv pentru *Lactobacillus helveticus*.

Prin înlocuirea atomului de sulf cu SO, se obţine *biotinsulfoxidul* (biotinsulfonă), care se comportă ca factor de creştere pentru *Aspergillus niger* şi *Neurospora crassa*, dar nu stimulează creşterea la şobolan, deşi îi măreşte supravieţuirea în carenţa de biotină.

Biocitina, care se obţine prin combinarea biotinei cu lizina, este unul din cei mai activi derivaţi ai biotinei. Ea a fost izolată sub formă cristalină din extractele hidrolizate de drojdie de către *L.D. Wright, K. Folkers* şi colab. în 1950. Este de 150 de ori mai activă decât biotina în creşterea speciei *Micrococcus sodonensis*, dar inactivă la *Lactobacillus arabinosus*. Prezintă acelaşi efect ca şi biotina asupra creşterii microorganismelor *Lactobacillus casei, Streptomyces faecalis, Neurospora crassa,*

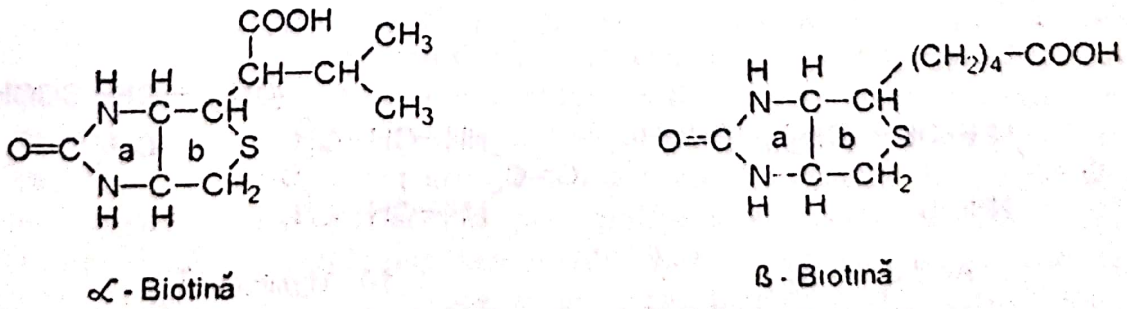


Fig. 14.1. Structura α- şi β-biotinei

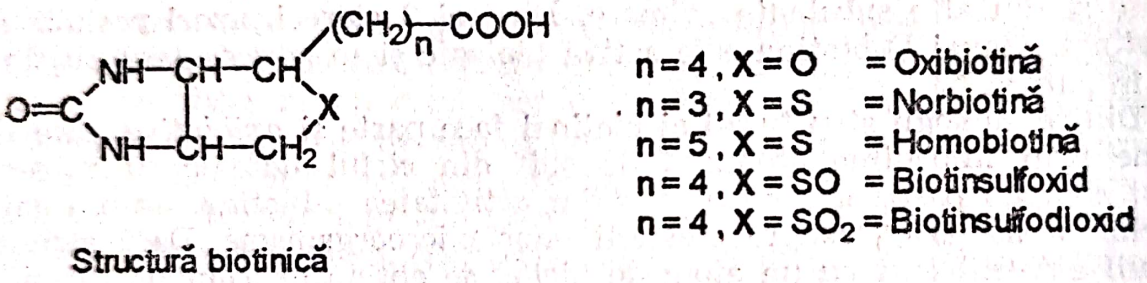
Sacharomyces carlsbergensis. Biocitina se scindează sub acțiunea biotinolazei din ficat, pancreas, mușchi, plasmă și din unele microorganisme în biotină și L-lizină. Ea nu este o formă enzimatică a biotinei întrucât se descompune foarte repede în corpul organismelor.

Dintre alți analogi structurali ai biotinei fac parte acidul *acthiazic*, *10-metil-biotina*, *biotinsulfodioxid*, *norbiotina* etc. (fig. 14.2), care manifestă inhibiție competitivă cu biotina la unele microorganisme.

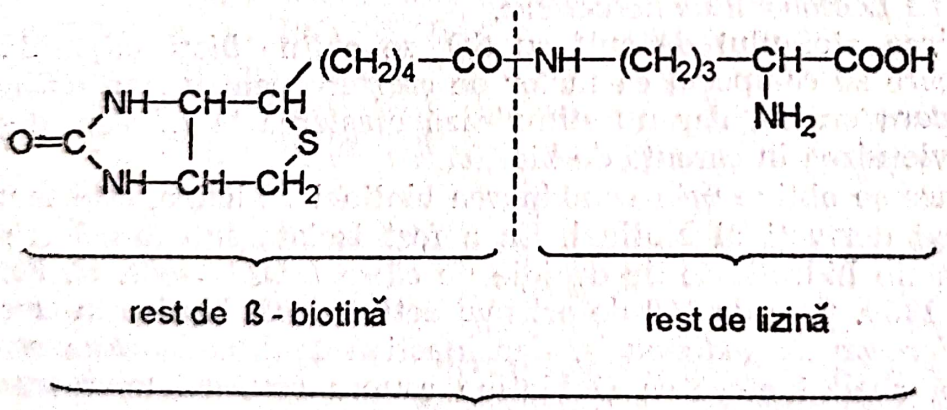
Tot din grupa analogilor structurali ai biotinei, face parte și *biotinolul*, alcoolul corespunzător, care este biotic activ pentru șobolan, dar biotic inactiv pentru *Lactobacillus arabinosus*.

Comportarea sa activă asupra șobolanului se explică prin capacitatea acestuia de a îl transforma în biotină, în diferite țesuturi.

Acțiunea specifică a biotinei este legată de integritatea inelului imidazolic din moleculă. Desfacerea biotinei la nivelul CO duce la obținerea unui produs cu două grupări aminice libere (acid diaminocarboxilic) de 10 ori mai puțin activ decât biotina (fig. 14.2).



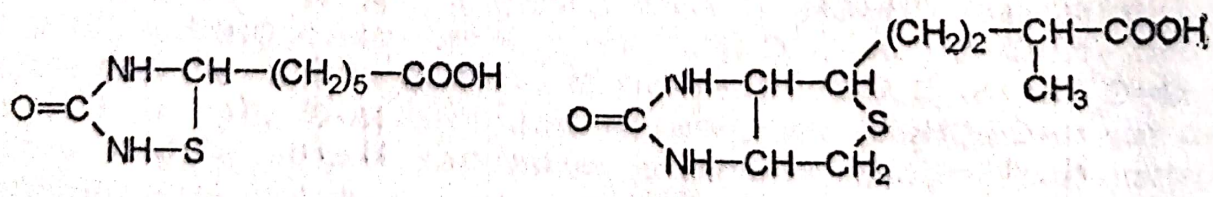
Structură biotinică



rest de ß - biotină

rest de lizină

Biocitină

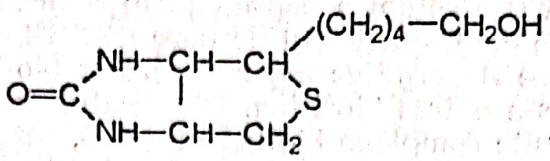


Acid acthiazic

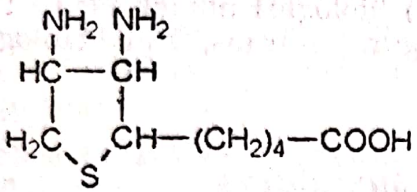
10 - Metilbiotină

Fig. 14.2. Structura unor analogi structurali ai biotinei

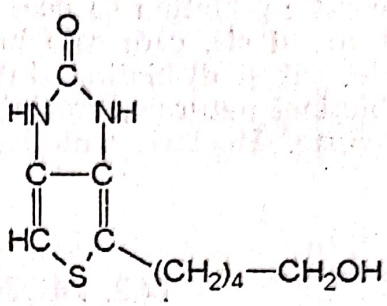
Scanned with OKEN Scanner



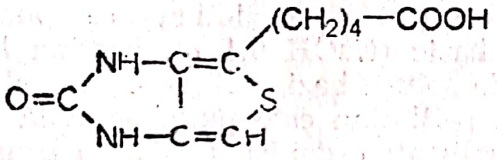
Biotinol



Acid diaminocarboxilic



Tetradehidrobiotinol



Tetradehidrobiotină

Analogi structurale ai biotinei

Homologii biotinei formați prin creșterea sau descreșterea catenei laterale nu posedă activitate biotinică. Unii dintre aceștia au chiar activitate antivitaminică.

Tetradehidrobiotinolul și tetradehidrobiotina sunt compuși inactivi biotinic, dar nu au activitate antibiotinică.

Biotina formează cu ovidina, albunină extrasă din albușul de ou nefiert, un complex protetic „biotinavidină", care se comportă ca o antivitamină biotinică. Complexul biotinavidină conține trei părți de biotină și o parte de avidină, o glicoproteidă cu masa moleculară de 53100 la pHi de 10,5. Se formează în oviductul păsărilor în stare de activitate germinală, sub acțiunea estrogenilor. Complexul biotinavidină este inactiv sub aspect biologic, întrucât cele două componente sunt puternic legate una de alta fiind rezistent în mediu acid și sub acțiunea enzimelor, fapt pentru care albușul de ou nefiert administrat în cantitate mai mare produce carență biotinică, prin blocarea activității biotinei. Prin fierberea oului se degradează (coagulează) avidina și astfel nu se blochează biotina existentă în organism. Complexul biotinavidină nu poate fi absorbit la nivelul tubului digestiv, nu poate fi scindat prin dializă și este rezistent față de enzimele proteolitice, fiind însă termolabil. Biotina, incorporată în diferite sisteme enzimatice, cu rol de coenzimă în reacțiile de carboxilare, decarboxilare și transcarboxilare, este legată labil de apoenzime, putându-se

Scanned with OKEN Scanner

elibera cu ușurință sub acțiunea pepsinei, sau a biotinidazei, enzimă specifică, izolată prima dată din ficatul de porc (BEDELEANU, 1985).

Din culturile de *Aspergillus niger* s-a izolat biotinsulfoxidul, iar din culturi de drojdii s-a extras biocitina. Din ficatul bovinelor și al câinilor s-au extras mai multe complexe biotină-proteină, care se descompun ușor prin hidroliză.

Teoretic β-biotina se poate obține sub 4 forme racemice, cu configurație trans și cis, care este inevitabilă. Atât β-biotina extrasă din surse naturale, cât și dl-biotina sintetică, care posedă numai 50% din activitatea biotinei naturale, prezintă activitate biologică numai dacă au o cis-configurație. Izomerii sintetici cu configurație trans, sunt biologic inactivi.

14.3. PROPRIETĂȚI ȘI BIOGENEZĂ

Proprietăți. Biotina se prezintă sub formă de cristale aciculare incolore, cu puncte de topire diferite pentru α- și β-biotină.

α-Biotina are punctul de topire la 230°C, iar unghiul de rotație a luminii monocromatice de (+)51°. β-Biotina are punctul de topire la 232—233°C în mediu bazic (NaOH 0,1 n). Biotina liberă este ușor solubilă în apă caldă și în soluții bazice diluate. Esterul său metilic este insolubil în apă și eter. β-Biotina este puțin solubilă în apă rece și acizi diluați, insolubilă în solvenți organici. β-Biotina prezintă un spectru de absorbție caracteristic la 234 nm, este optic activă dextrogiră și tensioactivă. Are punctul izoelectric la pH 3—3,5 și este ușor absorbită pe cărbune. Are masa moleculară de 244,3. Esterul metilic al biotinei se prezintă sub formă de plăci și are punctul de topire la 166—167°C. Este optic activ dextrogir cu unghiul de rotație (+)82° în metanol și (+)57° în cloroform 1%. Este insolubil în apă și eter, solubil în alcool și acetat de etil.

Unii cercetători susțin că autoclavarea produselor naturale timp de 2 ore la 120° în mediu de acid clorhidric concentrat (4—6 n), nu distrug biotina, care se eliberează din complexele proteice. Alți autori susțin că în condițiile menționate se degradează o parte din biotină.

Biotinele sunt inactivate de către baze alcaline și acizi tari, sub acțiunea cărora se transformă în sulfoxizi sau sulfone. Acilarea sau alchilarea biotinelor nu influențează activitatea lor biologică. Biotina are caracter de acid slab. Sulful din moleculă nu dă reacțiile sulfului anorganic. Prin oxidare formează o biotinsulfonă ($C_{10}H_{16}O_5N_2S$). În produsele naturale biotina se găsește în cea mai mare parte sub formă de complexe proteice, din care se eliberează prin hidroliză. Biotina prin combinare cu lizina formează biocitina, care s-a extras sub formă cristalină din drojdii. Biotina are capacitatea de-a se uni cu proteine și peptide, formând complexe stabile, neabsorbite prin intestin. Cu avidina (proteină) din albușul de ou, biotina formează complexul biotinavidină, formă sub care biotina nu este utilizată de celule. Avidina reprezintă o adevărată antivitamină, prin capacitatea sa de a bloca activitatea vitaminică a biotinei. Avidina se degradează prin încălzire la fierbere, fapt ce explică de ce albușul fiert nu prezintă proprietăți antivitaminice. Complexul biotin-

Scanned with OKEN Scanner

avidină este foarte stabil datorită marii afinități a biotinei față de avidină. Componentele sale nu se pot separa prin dializă. Ele pot fi scindate prin încălzire la 100°C și tratare cu apă oxigenată 0,45%. Complexul biotinavidină este foarte rezistent la acțiunea enzimelor proteolitice din tubul digestiv, mai bine decât avidina singură. S-a denumit ca Unitate Avidinică, cantitatea de avidină capabilă să se unească cu 1 μg de biotină. Derivații de biotină cu ciclul imidazolic deschis nu se combină cu avidina. Biotinsulfoxidul care are acțiune variabilă asupra microorganismelor, se combină cu avidina.

In practica farmaceutică se utilizează predominant esterul metilic al biotinei, care este insolubil în apă și eter, dar este ușor solubil în etanol, acetonă, cloroform. În organism, sub acțiunea hidrolazelor se eliberează cu ușurință biotina.

Biogeneză. Pe cale experimentală s-a observat că biotina poate înlocui acidul pimelic, care este un factor de creștere pentru *Corynebacterium diphtheriae*, iar acesta are o acțiune stimulatoare asupra biosintezei biotinei de către *Aspergillus niger*. Dacă în mediul de cultură pe care *A. niger* crește, se adaugă cisteină și cistină, cantitatea de biotină biosintetizată se dublează. Alți aminoacizi nu au efect stimulator. Dacă în același mediu de cultură se adaugă acid valerianic, marcat cu ^{14}C, cisteină și CO_2, se remarcă prezența ^{14}C în biotina biosintetizată. Din țesutul hepatic al puilor de găină și al șobolanilor s-au extras enzime care participă la sinteza biotinei „in vitro". Mecanismul intim al biosintezei biotinei încă nu se cunoaște integral. Pe baza a numeroase cercetări s-a stabilit că drojdiile, ciupercile inferioare din genurile *Penicillium* și *Aspergillus*, numeroase bacterii (*Corynebacterium diphteriae, Escherichia coli, Lactobacillus casei, L. bulgaricus, L. acidophylus*, unele specii de *Pseudomonas* etc.) și plantele pot biosintetiza biotina. Ca precursor al biotinei se consideră acidul pimelic care se formează din acidul azelainic. Dintre compușii care stimulează biosinteza acestei vitamine, fac parte cisteina, acidul aspartic, treonina, lizina, uracilul, acidul lactic, acizii grași nesaturați etc.

Omul și animalele superioare își asigură necesarul de biotină prin hrană și prin biosinteza florei intestinale. S-a observat că animalele de experiență excretă cantități mai mari de biotină decât cele ingerate, datorită, fără îndoială, activității florei intestinale. Administrarea de avidină sau de antivitamine care inhibă activitatea florei intestinale, micșorează în mod simțitor cantitatea de biotină din organism.

14.4. METODE DE IDENTIFICARE ȘI DOZARE

Metodele fizice și cele chimice sunt puțin utilizate pentru identificarea și dozarea biotinelor. Uneori se folosesc metode polarografice, cromatografice și spectrofotometrice, în reacția cu 4-dimetilaminobenzaldehida.

Metodele chimice folosesc ca test șobolani și pui de găină carențați cu avidină și alte antivitamine, fapt ce determină ca după 6—7 săptămâni de regim carențat să apară leziuni cutanante și oprirea creșterii în greutate. Se administrează apoi în hrană cantități determinate de biotină

și se urmărește vindecarea afecțiunilor produse de avitaminoza experimentală. Se consideră Unitate de biotină cantitatea de 5 μg biotină care administrează timp de 4 săptămâni, vindecă fenomenul de carență provocat la șobolani și la puii de găină.

Metodele microbiologice se utilizează pentru determinarea gradului de stimulare a creșterii la microorganismele *Saccharomices cerevisiae*, *Lactobacillus casei*, *L. helveticus*, *L. arabinosus*, *Ochromona danica* etc. pentru care biotina este o importantă substanță de creștere. Pentru drojdii se măsoară creșterea gradului de turbiditate a culturii, iar pentru bacterii creșterea conținutului în acid lactic. Testele microbiologice sunt sensibile numai la acțiunea biotinei libere și nu a celei combinate. Pentru utilizarea biotinei din complexe este necesară în prealabil hidroliza extractelor. Pentru separarea biotinei de compușii înrudiți și de metaboliții biologici se folosesc metode cromatografice.

O Unitate Internațională biotinică este egală cu 0,04 μg ester metilic al biotinei, care administrată zilnic la șobolanul carențat vindecă dermatita caracteristică.

14.5. RĂSPÂNDIRE ÎN NATURĂ

Biotina este una din vitaminele cele mai răspândite în produsele alimentare naturale, neprelucrate industrial. Gălbenușul de ou, rinichii, ficatul, drojdiile, cojile cerealelor, carnea de morun etc., reprezintă surse importante de biotină. Biotina este larg răspândită în organismele animale, vegetale și în microorganisme. În plante, cu excepția boabelor de cereale și a nucilor, biotina se găsește predominant în stare liberă, solubilă în apă, în timp ce în carne, drojdii, nuci, cojile cerealelor se găsește predominant sub formă de complexe proteice, insolubile în apă. Conținutul în biotină al unor produse alimentare se prezintă în tabelul 14.1.

Tabelul 14.1

Conținutul în biotină al unor produse alimentare, în ug/100 g

Produs	Conținut (μg/100 g)	Produs	Conținut (μg/100 g)
Gălbenuș de ou	300	Usturoi	3,5
Ficat de porc și vacă	250	Soia	4,0
Drojdia *Torula utilis*	133	Struguri	3,5
Rinichi de porc și vacă	100—200	Brânză	3,0
Ou întreg	100	Carne de oaie	2,7
Ciocolată	32	Orez nedecorticat	2,7
Fasole boabe	9,8	Carne de vacă	2,0
Carne de morun	8,0	Mazăre verde	1,1
Drojdie de bere	7,0	Lapte de femeie	0,8
Spanac	6,9	Făină de grâu	0,7
Drojdie de panificație	6,0	Varză albă	0,62
Porumb	5,8	Secară	0,57
Tărâțe de grâu	5,2	Mere	0,43
Lapte de vacă	5,0	Tomate	0,4
Morcovi	4,0	Cartofi	0,17
Ovăz	4,0	Albuș de ou	0
Piersici	4,0	Unt	0

Scanned with OKEN Scanner

Conținutul biotinei din plantele furajere uscate este de 16—40 µg/100g, iar în fructe între 0,01 și 19 µg/g. Conținutul biotinei scade în timpul preparării alimentelor cu aproximativ 20%, dar în același timp prin fierberea și prăjirea alimentelor, proteinele se degradează și nu pot forma cu biotina complexe neabsorbabile, rezistente la acțiunea enzimelor hidrolitice din tubul digestiv. Sugarii își procură biotina din laptele mamei. De remarcat este faptul că laptele uman este mult mai sărac în biotină decât laptele de vacă, dar copiii își procură o cantitate însemnată de biotină din gălbenușul de ou, produse făinoase și din produse lactate înăcrite.

14.6. ABSORBȚIE, EXCREȚIE ȘI NECESITĂȚI

Absorbție. Biotina se absoarbe la nivelul intestinului subțire ușor sub formă liberă. Complexele proteice și peptidice ale biotinei nu pot fi absorbite ca atare, ci numai în urma hidrolizării acestora sub acțiunea enzimelor digestive și a celor specifice numite biotinidaze. În sânge se găsesc biocitinliaze numite biocitinaze, capabile să desfacă biocitina și complexele biotinproteice, formate în organism. După administrarea orală a biocitinei, aceasta se desface în organism (ficat, rinichi, sânge etc.) în lizină și biotină, care se elimină prin urină în cea mai mare parte sub formă liberă.

Absorbția biotinei în stare liberă se face cel mai rapid în partea anterioară a intestinului subțire. După absorbție, biotina se răspândește prin intermediul sângelui la toate țesuturile. În cantitate mai mare se depozitează în ficat și rinichi, iar la păsări în gălbenușul de ou. Puține informații se cunosc în legătură cu transportul și depozitarea biotinei la om și la animale. Conținutul biotinei din sânge și cel eliminat prin urină variază în limite mari și nu reflectă un criteriu riguros al concentrației biotinei în alimente, mai cu seamă că o parte însemnată din biotina existentă în organismele animale este biosintetizată de flora intestinală.

Sângele omului adult conține 12—40 µg/100 ml, cu o distribuție în diferite organe care variază în raport de metoda de analiză folosită și de autori. În ficat și în glandele suprarenale, conținutul biotinei este cuprins între 0,6—0,7 µg/g. Plămânii, stomacul și inima conțin aproximativ 0,2 µg/g, iar splina, mușchii, ovarele și pielea între 0,02 și 0,06 µg/g.

Excreție. Biotina se elimină prin urină și fecale. Omul adult sănătos elimină prin urină aproximativ 30—60 µg de biotină pe zi și 15—200 µg prin fecale. Biotina eliminată prin fecale este de 3—6 ori mai mare decât aportul alimentar. Ea reprezintă patea neabsobită și o parte din cea existentă în flora intestinală. Cantitatea de biotină crește imediat după administrarea de biotină pe cale orală sau parentală. După 4 ore de la injectarea biotinei marcate, 16% din radioactivitate s-a găsit în ficat, 30% în urină și 4% în CO_2 expirat. Natura exactă a compnșilor de eliminare a biotinei încă nu se cunoaște pe deplin. Biotina se elimină în cea mai mare parte sub formă liberă și sub forma unor metaboliți care nu se pot combina cu avidina. În stări carențiale, cantitatea de biotină eliminată prin urină este foarte mult redusă, fiind de 5—6 µg/zi.

Scanned with OKEN Scanner

Necesități. Necesitățile omului și ale animalelor în biotină se asigură în mod normal prin aportul alimentelor și prin biosinteza acestei vitamine de către bacteriile intestinale. Se admite că pentru omul adult este necesară o cantitate de 150—300 μg/zi, iar pentru copii sub 11 ani între 20—50 μg/zi, în medie 2—4 μg/kg greutate corp. Mai recent, în SUA se recomandă pentru omul adult 30—100 μg/zi, având în vedere cantitatea mare produsă de flora intestinală. În Franța, Africa de Sus și Singapore se recomandă cantități sporite de biotină până la 300—400 μg/zi pentru adulți. Necesitățile în biotină pentru oameni cresc în urma tratamentelor cu antibiotice, sulfamide sau cu compuși cu acțiune antagonistă.

La maimuță, necesitățile în biotină sunt de 20, la porc de 100, la șobolan 0,5—3, iar la puiul de găină între 0,65—10 μg/g. Având în vedere felul produselor alimentare și aportul florei intestinale necesitățile reale în biotină sunt greu de stabilit.

14.7. ROL ȘI ACTIVITATE BIOCHIMICĂ

Biotina are un rol important în creșterea și funcționarea normală a organismelor animale și vegetale. Are un rol cheie în metabolismul glucidelor, lipidelor și al proteinelor, precum și în metabolismul energetic celular. Face parte din numeroase sisteme enzimatice care iau parte în biosinteza acizilor grași, a unor aminoacizi și glucide. Este un factor de creștere pentru drojdii, ciuperci și numeroase microorganisme. Ia parte directă la formarea și funcționarea pielii, fiind denumită în trecut și „factor dermic". Se găsește în toate celulele vii și este biosintetizată de flora intestinală.

Biotina constituie grupul protetic (coenzima) al multor sisteme enzimatice biotinice, care au un rol esențial și specific în procesele de carboxilare, adică în fixarea CO_2 sau HCO_3^-, în decarboxilări reversibile și în transcarboxilări, realizând transferul grupărilor C_1.

Se atribuie biotinei rolul de „coenzimă", întrucât participă la reacțiile de carboxilare și decarboxilare reversibilă a cetoacizilor polibazici, la dezaminarea unor aminoacizi, biosinteza acidului aspartic, biosinteza acidului oleic etc. Biotina, implicată în diferite sisteme enzimatice, ia parte la biosinteza acizilor grași și a colesterolului, la biosinteza, dezaminarea și interconversiunea unor aminoacizi, biosinteza bazelor azotate purinice și pirimidinice, în biosinteza acizilor nucleici și a proteinelor tisulare și enzimatice. Are de asemenea un rol însemnat în stimularea biosintezei vitaminei C, activarea glucokinazei, în menținerea raportului optim între NADH/NAD, integritatea mitocondriilor, funcționarea optimă a ciclului Krebs și a fosforilării oxidative, stimularea urogenezei etc.

In sistemele enzimatice biotindependente, biotina reacționează prin gruparea sa carboxilică cu o grupare aminică a apoenzimei, formând astfel un complex enzimatic biotinilenzimă, care s-a format prin intermediul unei legături peptidice între cele două componente. Datorită acestei legături covalente biotina nu se poate separa de apoenzimă prin simplă dializă, ci numai în urma unui proces de hidroliză. *F. Lynen* a obținut complexul biotinilenzimă în stare cristalină și a descoperit că biotina se poate lega de apoenzimă și prin intermediul ciclului imidazolic. Tot la

Scanned with OKEN Scanner

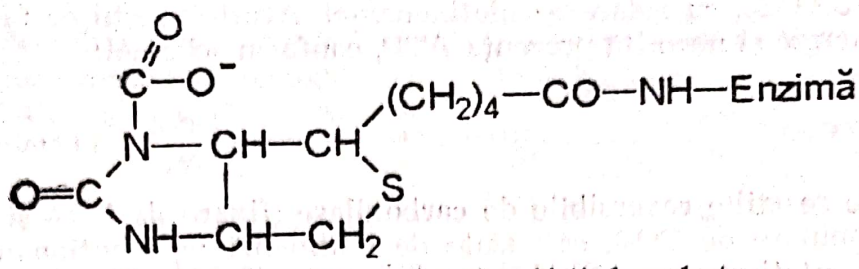


Fig. 14.3. Structura unei enzime biotindependente

nivelul ciclului imidazolic, enzima leagă o moleculă de CO_2 transformând-o în acid carbonic activ. Biotina este un acceptor specific de CO_2 pe care îl transformă în grupare carboxilică prin legarea sa de un atom de azot din ciclul imidazolic al biotinei.

Structura unei enzime biotindependente se prezintă în figura 14.3.

Sistemele enzimatice biotindependente și reacțiile catalizate de acestea se prezintă în tabelul 14.2.

Enzimele biotindependente au un dublu rol în procesele metabolice, primul rol se manifestă în importante procese de degradare, iar al doilea, în procese centrale de biosinteză. Astfel, acetil-CoA-carboxilaza catalizează legarea CO_2 de acetil-CoA, cu formarea malonil-CoA, un produs intermediar în biosinteza endogenă a acizilor grași, în timp ce piruvatdecarboxilaza catalizează formarea acidului oxalilacetic din acid piruvic și CO_2. Biotinenzimele necesită pentru mărirea eficienței catalizarii unor reacții biochimice, prezența unor activatori (acetil-CoA, Mg^{2+}, acid citric, acid izocitric etc.). Se pare că acești activatori influențează conformația moleculei proteice, îndeplinind rolul de reglatori ai catalizei enzimatice. Complexul biotinenzimă — CO_2 activ, conține 4,7 Kcal/mol, la pH 7, astfel încât biotinenzimele se pot încadra între substanțele macroergice, bogate în energie. În reacțiile de carboxilare, biotinenzimele cedează CO_2 activ legat de ciclul imidazolic altor acceptori de CO_2, iar diaminobiotinenzima rezultată prin degarboxilare este capabilă să fixeze o nouă

Tabelul 14.2

Reacții biochimice catalizate de enzime biotindependente

Reacții biochimice	Enzime biotindependente
Acetil-CoA + CO_2 ⇌ Malonil-CoA	Acetil-CoA-carboxilaza
β-Metilcrotonil-CoA ⇌ β-Metilglutaconil-CoA + CO_2	β-Metilcrotonil-CoA-carboxilaza
Propionil-CoA + CO_2 ⇌ Metilmalonil-CoA	Propionil-CoA-carboxilaza
Acid piruvic + CO_2 ⇌ Acid acetilacetic	Piruvatcarboxilaza
Malonil-CoA + Acid piruvic ⇌ Propionil-CoA + + Acid oxalilacetic	Malonil-CoA-carboxiltransferaza

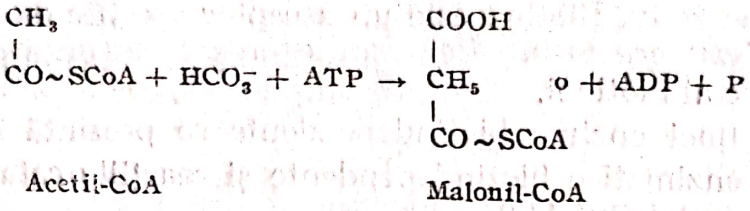
Scanned with OKEN Scanner

moleculă de CO_2, cu refacerea biotinenzinei. Aceste reacții se fac cu consum de energie și necesită prezența ATP, conform schemei:

$$\text{Biotinenzimă-COO}^- \xrightarrow[-CO_2]{ATP \rightarrow ADP+P} \text{Diaminobiotinenzimă} \xrightarrow[ATP]{+CO_2} \text{Biotinenzimă-COO}^-$$

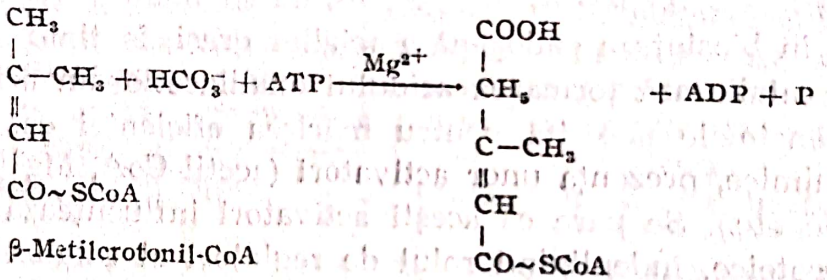
Dintre reacțiile reversibile de carboxilare (fixare de CO_2) și decarboxilare (eliminare de CO_2), catalizate de biotinenzime, menționăm pe cele mai reprezentative:

— carboxilarea acetil-CoA cu formare de malonil-CoA sub acțiunea acetil-CoA-carboxilazei.



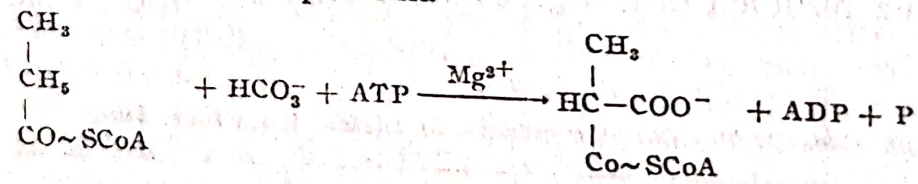
Acetil-CoA — Malonil-CoA

— carboxilarea β-metilcrotonil-CoA cu formare de β-metilglutaconil-CoA. Enzima β-metilcrotonil-CoA-carboxilaza s-a obținut în stare pură din extracte de *Micobacterium* și conține o moleculă de biotină și o moleculă proteică cu masa moleculară de 344000 UMA



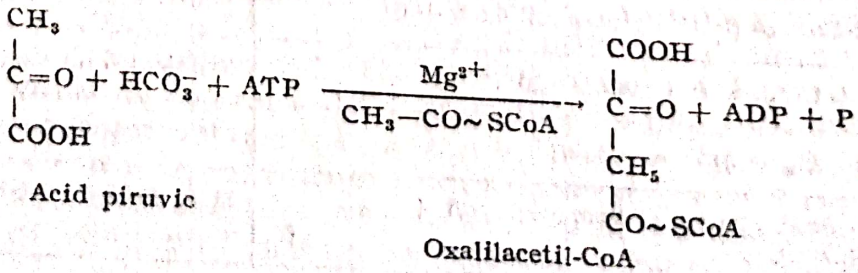
β-Metilcrotonil-CoA — β-Metilglutaconil-CoA

— carboxilarea propionil-CoA cu formare de metilmalonil-CoA. Propionil-CoA-carboxilază, care catalizează această reacție, s-a obținut în stare cristalină din mitocondriile ficatului de bou. Ea conține 4 molecule de biotină și o moleculă de proteină



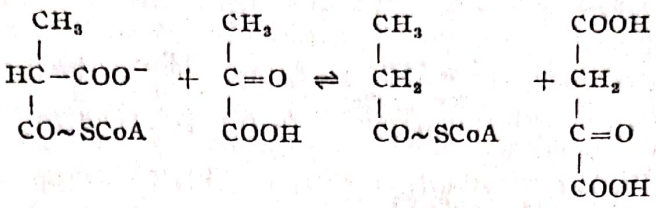
Propionil-CoA — Metilmalonil-CoA

— carboxilarea acidului piruvic cu formare de acid oxalilacetic este catalizată de piruvatcarboxilază, enzimă larg răspândită în oganismele vegetale și în microorganisme



Acid piruvic — Oxalilacetil-CoA

— decarboxilarea metilmlonil-CoA în prezența acidului propionic, sub acțiunea metilmalonil-oxalacetic-transcarboxilaza, determină formarea propionil-CoA și a acidului oxalilacetic



Metilmalonil-CoA Acid piruvic Propionil-CoA Acid oxalilacetic

β-Decarboxilazele sunt enzime specifice care intervin în reaițiile de fixare reversibilă a CO_2 și de decarboxilare. Așa sunt reacțiile:

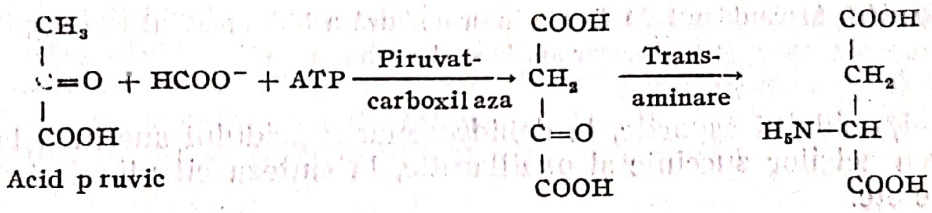
$$\text{Acid pruvic} + CO_2 \rightleftharpoons \text{Acid oxalilacetic}$$

$$\text{Acid } \alpha\text{-cetoglutaric} + CO_2 \rightleftharpoons \text{Acid oxalilsuccinic}$$

$$\text{Ornitină} + CO_2 \rightleftharpoons \text{Citrulină}$$

$$\text{Acid succinic} \rightleftharpoons \text{Acid proprionic} + CO_2$$

Biotina are un rol însemnat în biosinteza acidului aspartic, din acid piruvic și CO_2 prin intermediul acidului oxalilacetic, care prin aminare reductivă sau transaminare formează acidul aspartic.

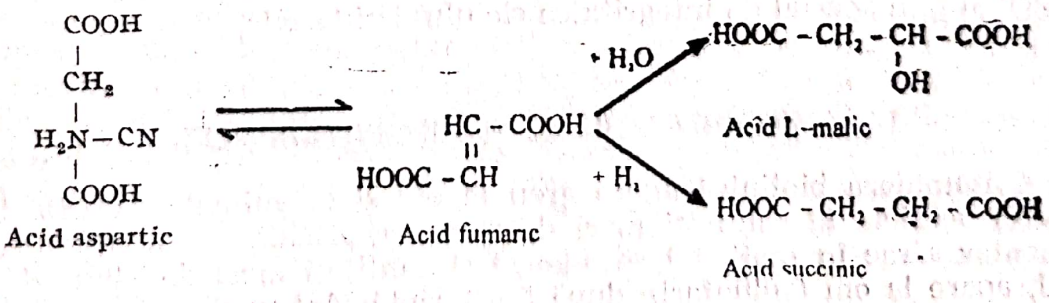


Acid piruvic Acid oxalilacetic Acid aspartic

Organismele în carență biotinică nu pot sintetiza acidul aspartic, dar prin administrare de biotină își recapătă capacitatea de biosinteză.

Biotina este direct implicată în dezaminarea unor aminoacizi (acid aspartic, acid glutamic, serină, treonină etc.).

La *Escherichia coli* prin dezaminarea intramoleculară a acidului aspartic se obține acidul fumaric, din care prin hidroxilare se obține acidul L-malic, iar prin hidrogenare, acidul succinic:



Acid aspartic Acid fumaric Acid L-malic Acid succinic

În reacțiile de decarboxilare și cele de dezaminare, biotina se pare că ar suferi unele modificări structurale în ciclul imidazolic, prin fixarea intermediară de hidrogen, conform mecanismului din figura 14.4. Se pare că prin acest mecanism biotinezimele ar participa la dezaminarea serinei,

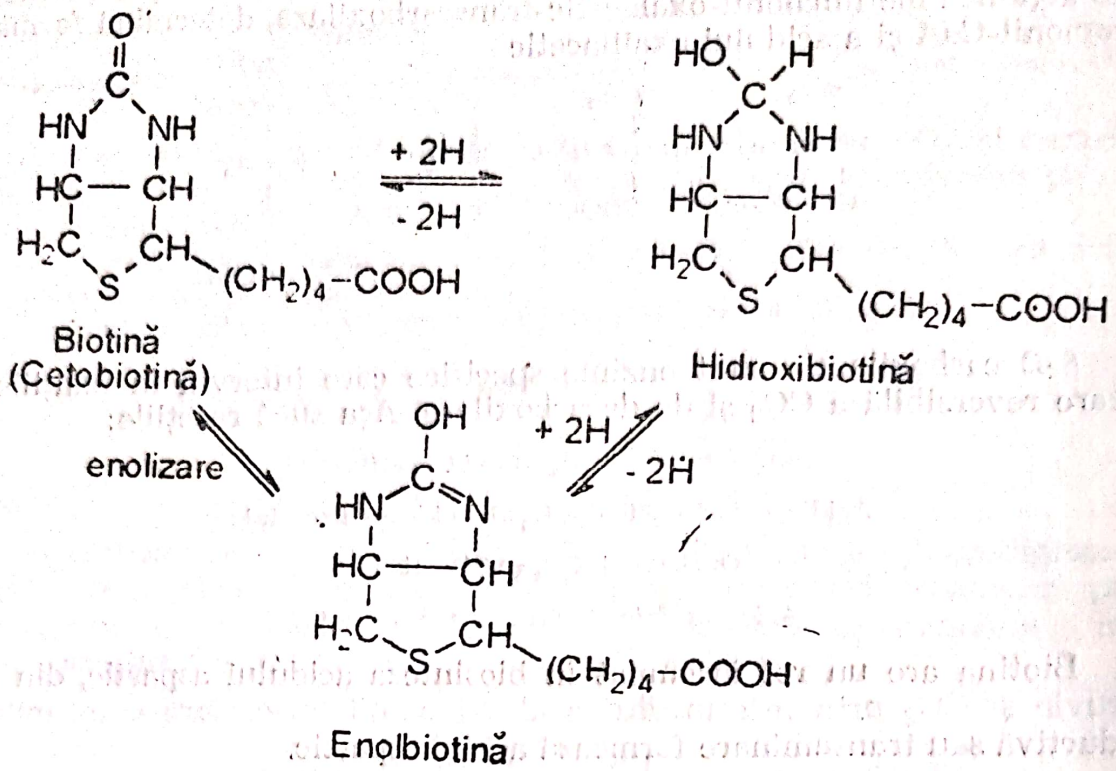


Fig. 14.4. Mecanismul de fixare intermediară a hidrogenului în reacțiile de decarboxilare și dezaminare

treoninei, acidului aspartic, la dehidrogenarea acidului succinic, la decarboxilarea acizilor succinic și oxalilacetic, la sinteza citrulinei și a acidului oleic etc.

Biotina contribuie la biosinteza acidului oleic. Experimental s-a stabilit că acidul oleic și lipidele care îl conțin în structura lor moleculară, pot înlocui biotina, în prezența acidului aspartic, din mediul de cultură al unor lactobacili biotindependenți. Acidul oleic pe de altă parte poate anihila acțiunea unor antivitamine biotinice, fapt ce confirmă indirect participarea biotinei în biosinteza acidului oleic. Biotina are un rol biochimic multiplu, putând să catalizeze reacții de carboxilare, decarboxilare, dehidrogenare și dezaminare, în funcție de sistemul enzimatic în care este inclusă. Specificitatea sa de acțiune este dependentă de structura moleculară, în special de integritatea ciclului imidazolic.

14.8. HIPOVITAMINOZE ȘI HIPERVITAMINOZE

Avitaminoza biotinică apare greu la om și la animale datorită biosintezei acesteia în cantități mari de flora intestinală. Dacă unui regim alimentar sărac în biotină i se adaugă și cantități mari de albuș de ou crud, apare la om (voluntari), după 5—6 săptămâni unele simptome care se atribuie carenței de biotină, cum sunt: dermatite la extremități, somnolență, paloarea pielii, oboseală, astenie, dermatită seboreică, dureri musculare și precardiale, căderea părului, atrofia papilelor limbii, lipsa de apetit, greață, hemoragii etc. Scade excreția urinară a biotinei, apare

hipercolesterolemie, scade biosinteza bazelor azotate și a glicogenului. Scade activitatea hexokinazei, a piruvicocarboxilazei. Se reduce capacitatea respiratorie a mitocondriilor și fosforilarea oxidativă etc. Toate aceste tulburări se suprimă prin administrarea parentală de biotină și reflectată în același timp rolul biochimic important al acestei vitamine.

La șobolan, deficiența în biotină se caracterizează prin dermatită eczematoasă, căderea părului în jurul ochilor, spasme ale membrelor inferioare, paralizie. Adăugarea biotinei în hrana șobolanilor determină o creștere a biosintezei lipidelor și a colesterolului în ficat. Șobolanii necesită biotina prioritar pentru procesul de gestație. La șoareci, biotina este necesară în primul rând pentru reproducere și lactație.

La păsări, carența în biotină se manifestă prin dermatite și perosis care se dezvoltă treptat. Un aport de biotină de 7—10 μg/100 g de alimente, suprimă aceste efecte și stimulează creșterea.

Carența biotinică la animale se realizează prin administrare de hrană săracă în biotină, consum mare de albuș de ou crud și administrarea de antivitamine care să distrugă flora intestinală. Ca simptome generale se produce oprirea creșterii, apar dermatite, căderea părului, iar în stările carențiale îndelungate apar paralizii, tulburări endocrine și neuromusculare. Se produce o inflamare și descuamare a pielii. Secreția glandelor sebacee încetează și pielea devine aspră. Se dezvoltă ușor conjunctivite.

Nu s-au constatat stări de hipervitaminoze la om și la animale, deoarece biotina nu prezintă toxicitate nici la administrarea unor doze mari de 350 μg/Kg greutate corp dată oral sau 1000 mk/kg greutate corp date intravenos la șoareci și șobolani. Dacă administrarea dozelor mari de biotină durează o perioadă mai îndelungată este posibil să se producă steatoză hepatică și să se intensifice dezvoltarea tumorilor.

14.9. INTERRELAȚII VITAMINICE ȘI HORMONALE

Intre vitamina C și biotină există o acțiune sinergică în multe transformări metabolice. La fel un sinergism se manifestă între biotină și acidul pantotenic. Carența de acid pantotenic este atenuată prin aport de biotină și invers. În carență de biotină scade și conținutul tiaminei. Biotina are acțiune sinergică și cu acidul folic. Ea stimulează biosinteza acizilor folici în țesuturi, iar aceștia stimulează creșterea microorganismelor biotindependente. Biotina împreună cu folații, stimulează metabolismul și funcțiile acidului pantotenic. Interrelații biochimice se stabilesc între biotină, folați și vitamina B_{12} în transferul unităților C_1. Eficiența biotinei este mai mare în prezența altor factori de creștere din complexul B, cum sunt: acidul pantotenic, acidul folic, vitaminele PP, B_1, inozitolul etc. Intre biotină și vitamina B_2 s-a stabilit o relație antagonică în tratarea tumorilor provocate de galbenul de unt. Tot o relație antagonică s-a stabilit și între acidul p-aminobenzoic și biotină. Acizii grași inactivează biotina, proces împiedicat de tocoferoli.

Hormonii estrogeni scad simptomele carențiale ale biotinei, dar testosteronul le accentuează. La animalele corticosuprarenalectomizate crește rezistența la stres.

Scanned with OKEN Scanner

14.10. ANTIVITAMINE

Pe lângă analogii structurali ai biotinei cu acțiune antivitaminică prezentați în figura 14.2, în această grupă de compuși se încadrează și destiobiotina, care se deosebește de biotină prin lipsa atomului de sulf din moleculă (fig. 14.5). Destiobiotina este la fel de activă ca și biotina pentru unele microorganisme (*Saccharomyces cerevisiae, Neurospora crassa, Escherichia coli, Penicillium notatum* etc.) dar este un antagonist competitiv pentru *Lactobacillus casei*.

Oxibiotina, care în loc de sulf conține oxigen în moleculă (fig. 14.2), prezintă o activitate biochimică mult mai redusă decât a biotinei. Microorganismele o folosesc ca atare, fără să o mai transforme în biotină. Se pare deci că atomul de sulf din molecula biotinei nu este riguros necesar pentru activitatea biochimică a acesteia.

Din biotină s-au obținut unii inhibitori ca biotinsulfona (biotinsulfoxid), homobiotina, biotinsulfodioxid, norbiotina, acidul acthiazic, 10-metilbiotina (fig. 14.2), care sunt antagoniști ai biotinei pentru diferite microorganisme *(Lactobacillus cerevisiae)*. Tot în această categorie de antagoniști ai biotinei se încadrează și acidul oxibiotinsulfonic, desmetildestiobiotina, numit și acid imidazolincapronic, homooxibiotină etc. (fig. 14.6).

Biotinsulfona și acidul imidazolincapronic inhibă creșterea drojdiilor și a microorganismului *Lactobacillus casei*, iar biotina adăugată în mediul de cultură contracarează această acțiune. Destibiotina inhibă *Lactobacillus casei*, dar stimulează creșterea ciupercilor. Toate aceste antivitamine dau compuși cu avidina.

Dintre antivitaminele nonhomoloage cu biotina, activitate antivitaminică intensă o prezintă avidina, o proteină din albușul de ou, care se combină ușor cu biotina și formează complexul avidinbiotinic, neabsorbabil prin celule. Este posibil ca acest complex să aibă un rol însem-

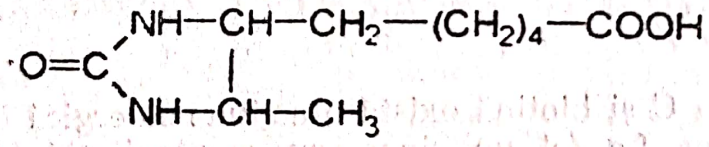


Fig. 14.5. Structura Destiobiotinei.

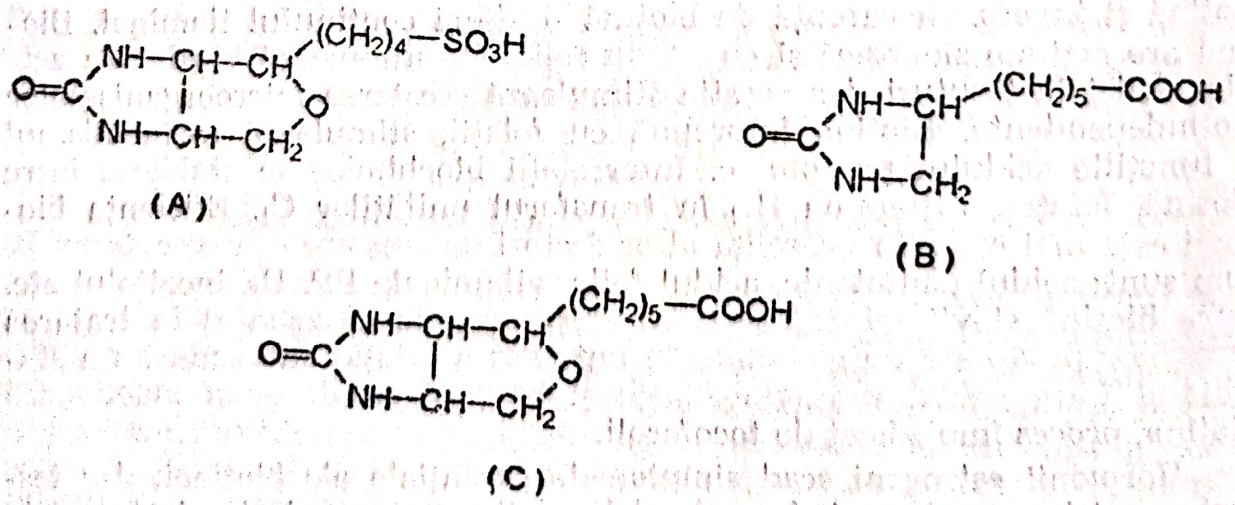


Fig. 14.6. Structura unor analogi structurali ai biotinei

nat în fiziologia embrionului. Biotina activează lizozimul, enzimă care se găseşte în albuşul de ou, având o acţiune de bază şi asupra microorganismelor. Biotina se găseşte în cantitate mare în gălbenuşul de ou sub forma unui complex proteic cu moleculă mare, nedializabil, iar avidina, antagonistul său se află în albuşul de ou.

Antivitaminele biotinei sunt tot mai mult utilizate în terapia tumorilor.

14.11. INDICAŢII TERAPEUTICE ŞI FARMACEUTICE

Biotina se utilizează în terapie mai ales în asociere cu alte vitamine B, pentru îmbunătăţirea metabolismului glucozei, biosinteza acizilor graşi, interconversiunea aminoacizilor etc. Tratamente cu biotină se aplică la pacienţii cu aclorhidrie, în urma rezecţiilor stomacale, când absorbţia biotinei este deficitară, fiind redusă foarte mult şi excreţia biotinei. Tratamentul se face cu doze ce conţin 250 la 500 μg/zi de biotină, administrată orală, timp de 4—8 săptămâni. În tratamentul dermatitei seboreice se dau 3—10 mg/zi biotină, administrată parental.

Biotina în asociere cu alte vitamine sau medicamente se recomandă în hepatita infecţioasă, în ciroză, ateroscleroză, alcoolism, diabet, în boli neuropsihice (schizofrenie, parkinsonism), distrofii musculare. Întrucât biotina manifestă efecte protectoare la şobolan faţă de agenţii cancerigeni (galben de unt, N,N-dimetilaminoazobenzol) şi are un conţinut mai redus în ţesuturile tumorale faţă de cele normale, s-a recomandat asocierea biotinei în terapia cancerului.

Întrucât avitaminoza biotinică este foarte rară la om, practic aproape inexistentă, necesitatea unor preparate de biotină este mică. În farmacii se dau concentrate din extracte de ficat sau drojdii, cu conţinut variabil de biotină. S-au realizat de asemenea, unguente cu concentrate de biotină, având în vedere resorbţia cutanată uşoară a biotinei. Se găsesc şi tablete, drajeuri şi fiole cu biotină metilată. Eventualele hipovitaminoze naturale şi cele produse artificial se tratează bine cu extracte de ficat sau de drojdii, însoţite de un regim alimentar bogat în ficat, rinichi, gălbenuş de ou, tărâţe de cereale, lapte etc. Se pot administra în hrană şi doze zilnice de 5—20 mg biotină. Dozele de 60 μg biotină pentru adulţi şi 20 μg/zi la copii, sunt recomandate pentru menţinerea concentraţiei constante a biotinei în sânge.

Biotina se produce pe cale industrială încă din 1949, iar D-biotina sintetică pură este identică cu cea naturală. Biotina este adăugată ca supliment în laptele şi hrana sugarilor, ca produs dietetic care asigură creşterea şi funcţionarea normală a organismelor. Biotina se adaugă ca supliment în mediile de fermentaţie cu drojdii, întrucât este un factor esenţial de creştere a acestora. De asemenea, biotina se adaugă în mediile ce folosesc biotehnologii moderne unde acţionează enzime biotindependente. În cosmetică biotina se utilizează ca un ingredient pentru întreţinerea şi prevenirea căderii părului.

Scanned with OKEN Scanner

Capitolul 15. ACIDUL PARAAMINOBENZOIC (PAB)

15.1. Scurt istoric 364
15.2. Structură şi compu şi înrudiţi 365
15.3. Proprietăţi şi oţinere 365
15.4. Metode de identificare şi dozare 366
15.5. Răspândire în natură 367
15.6. Absorbţie, excreţie şi necesităţi 368
15.7. Rol şi activitatea biochimică 369
15.8. Hipovitaminoze şi hipervitaminoze 370
15.9. Antivitamine şi relaţii intervitaminice 371
15.10. Indicaţii terapeutice şi farmacologice 371

Acidul p-aminobenzoic (PAB) a fost introdus în grupul vitaminelor B după 1940 când s-a constatat acţiunea sa antagonistă faţă de sulfonamide, substanţe cu acţiune antibacteriană puternică. În decursul timpului, din 1863 când a fost sintetizat de E. Fischer, PAB a purtat mai multe denumiri: de *vitamină antiacromatică*, deoarece previne şi vindecă decolorarea părului şi a pielii, *factor de creştere a puiului de găină*, *factor de prevenire a atromotrichiei* (decolorarea părului), *factorul P de creştere a bacteriilor*, *factor* B_x, *vitamina H'*, *vitamina* H_2, *PABA*, *Gerovital* H_3, *Aslavital* etc. PAB este un factor de creştere indispensabil pentru numeroase microorganisme, inclusiv pentru cele din flora intestinală. Are proprietăţi vitaminice asupra multor specii superioare de animale. Este un component structural al acizilor folici şi folinici. Este un factor anabolic important folosit în prevenirea şi tratarea afecţiunilor ce însoţesc procesele de îmbătrânire.

15.1. SCURT ISTORIC

Acidul p-aminobenzoic a fost sintetizat în 1863 de către *E. Fischer* prin reducerea acidului p-nitrobenzoic cu $(NH_4)_2S$ în mediu de acid sulfuric. Este cunoscut de multă vreme ca produs intermediar în sinteza unor anestezice locale ca *anestezina*, *novocaina* sau *procaina*, *cicloform* etc. Este trecut în grupul vitaminelor B din 1940, când *B. Wood* şi *H. Fildea* au demonstrat antagonismul dintre acidul p-aminobenzoic şi sulfamide asupra microorganismelor. Acest antagonism stă la baza chi-

Scanned with OKEN Scanner

mioterapiei moderne. PAB participă în structura acizilor folici și folinici cu care are acțiuni sinergice în numeroase procese metabolice. În lipsa acidului p-aminobenzoic din hrană se accentuează simptomele carenței de acid folic. În 1941 s-a stabilit că PAB este un factor de protecție pentru șobolan împotriva decolorării părului și un factor de creștere a puiului de găină. Tot în 1941 s-a descoperit rolul său eficace în acromotrichia de nutriție la om.

15.2. STRUCTURĂ ȘI COMPUȘI ÎNRUDIȚI

Structura acidului p-aminobenzoic se prezintă în figura 15.1. Acidul p-aminobenzoic are numeroși analogi structurali, care se obțin prin înlocuirea atomului de hidrogen din gruparea carboxilică cu diferiți radicali. Acești compuși au aplicații în anestezie. Denumirea și structura radicalilor principalilor compuși anestezici este următoarea:

- anestezina ; R = $-CH_2-CH_3$
- cicloform ; R = $-CH_2-CH-(CH_3)_2$
- butezina ; R = $-(CH_2)_3-CH_3$
- larocaina ; R = $-CH_2-C-(CH_3)_2-CH_2-N-(C_2H_5)_2$
- tutocaina ; R = $-CH(CH_3)-CH(CH_3)-CH_2-N-(CH_3)_2$
- novocaina ; R = $-CH_2-CH_2-N-(C_2H_5)_2$

Novocaina sau procaina este principiul activ de bază al gerovitalului H_3 și aslavitalului.

Sulfamidele au structura moleculară similară cu a acidului p-aminobenzoic și prezintă puternice proprietăți antivitaminice PAB (fig. 15.2).

15.3. PROPRIETĂȚI ȘI OBȚINERE

PAB se prezintă sub formă de cristale aciculare, incolore, dispuse în snopi, cu punct de topire la 187°C. Sub formă de acid este greu solubil în apă rece (0,5%), mai ușor solubil în apă caldă, etanol, în soluții

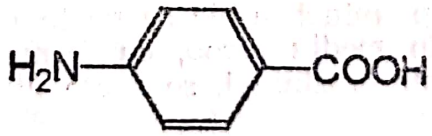


Fig. 15.1. Structura acidului paraaminobenzoic

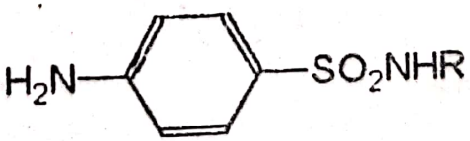


Fig. 15.2. Structura generală a sulfamidelor

de hidroxizi și carbonați alcalini. Este foarte puțin solubil în cloroform. Sarea sa de sodiu se dizolvă bine în apă. PAB este rezistent la acțiunea acizilor tari (HCl), dar este sensibil la acțiunea hidroxizilor alcalini, a cromului și chiar a acidului azotic. Soluțiile apoase se distrug sub acțiunea aerului. Cu alcoolii formează esteri, care sunt insolubili în apă. Esterul metilic al PAB-ului are punct de topire la 110°C, iar cel etilic se numește anestezină.

Acidul p-aminobenzoic, la fel ca și novocaina, absoarbe radiații UV în jur de 297,5 nm, care sunt radiațiile ce cauzează eritemul și pigmentarea persistentă a pielii.

In organism, PAB se acilează, formă sub care alături de acidul diaminohipuric (PAH) se elimină prin urină.

PAB se poate obține ușor prin reacția acidului p-brombenzoic cu amoniacul marcat (^{15}N) (fig. 15.3).

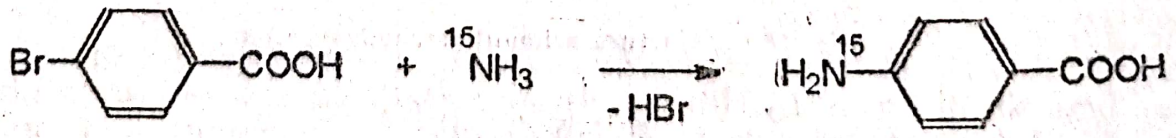
Este biosintetizat de numeroase microorganisme, inclusiv de flora intestinală a omului și animalelor, precum și în diferite plante. Acidul p-aminobenzoic existent în alimente, sub formă de complexe, se obține în stare liberă sub acțiunea enzimelor digestive.

15.4. METODE DE IDENTIFICARE ȘI DOZARE

Acidul p-aminobenzoic se găsește în natură în stare liberă, combinat cu proteinele și inclus în structura acizilor folici, folinici și a derivaților acestora.

Metodele chimice se bazează pe reacțiile de culoare care se obțin prin tratarea PAB în stare liberă cu aril-aminediazotate cu diferiți reactivi, dintre care cei mai utilizați sunt dimetil-α-naftalina și diclorat de N(1-naftil)-etilendiamina. În urma reacțiilor se obțin colorații roșii care se pot colorimetra. Aceste reacții nu sunt specifice deoarece sunt date de numeroase arilamine primare, de sulfamide, anilină, precum și de fenoli, crezoli etc. Acidul p-aminobenzoic sub formă legată din alimente, sânge urină (forma acetilată) și din materiale biologice nu dă aceste reacții. Pentru eliberarea PAB se face hidroliza produselor în care se află, cu HCl 4 n, timp de o oră la 100°C. Pentru determinarea PAB în stare liberă și combinată se face dozarea acestuia înainte și după hidroliză produselor sau lichidelor biologice. Pentru dozarea PAB-ului din sânge se face în prealabil deproteinizarea acestuia cu acid tricloracetic.

Dozarea acidului p-aminobenzoic se poate realiza prin acțiunea tirozinazei asupra sa, în mediu aerob, cu formarea unui compus roșu, stabil la pH 5. În locul tirozinazei, se poate utiliza sulfatul feric.



Acid p - bromobenzoic

Acid p - aminobenzoic (PAB)

Fig. 15.3. Obținerea PAB din acid p-brombenzoic și amoniac

Scanned with OKEN Scanner

Vitamina B_1 diazotată dă cu PAB un compus de culoare roşie, solubil în alcool izoamilic. Cu p-dimetilaminobenzaldehida soluţie 1%, în prezenţa acidului acetic, PAB în soluţie diluată, dă după 5 minute o coloraţie galbenă.

Acidul p-aminobenzoic dă cu β-naftolul, HCl 10% şi $NaNO_2$ 10% un precipitat roşu portocaliu. Izomerii acidului p-aminobenzoic dau reacţii de culoare diferite cu $K_4[Fe(CN)_6]$ şi $K_3[Fe(CN)_6]$. Astfel, acidul p-aminobenzoic dă cu ferocianura de potasiu o culoare brună, iar cu fericianura de potasiu o culoare verde-brună. Acidul m-aminobenzoic dă cu $K_4[Fe(CN)]_6$ o culoare violetă, iar acidul o-aminobenzoic nu dă reacţii de culoare.

Prin metode cromatografice se poate realiza separarea compuşilor înrudiţi structural cu PAB, cum sunt acidul p-aminosalicilic (PAS), acidul p-aminohipuric (PAH) etc.

Metodele microbiologice sunt mai sensibile şi oarecum mai specifice decât cele chimice. Ele folosesc ca test de creştere microorganisme ca *Leuconostoc arabinosus, L. mesentheroides, Neurospora crassa, Acetobacter suboxydans, Clostridium acetobutilicum, E. coli* etc.

O altă metodă constă în efectul pe care îl au sulfamidele pentru blocarea acţiunii acidului p-aminobentoic şi invers. Pentru această metodă se foloseşte o tulpină de *Proteus X 19* şi se măsoară atât cantitatea de sulfamide, cât şi cea de PAB, care se neutralizează reciproc.

Metodele biologice se bazează pe acţiunea preventivă sau curativă ce o are PAB asupra atromotrichiei la şobolan sau asupra creşterii la puii de găină.

15.5. RĂSPÂNDIRE ÎN NATURĂ

Acidul p-aminobenzoic este larg răspândit în natură în organismele animale, vegetale şi în numeroase microorganisme pentru care reprezintă un factor de creştere esenţial. În produsele naturale PAB se găseşte în stare liberă, combinat cu proteine tisulare, inclus în molecula acizilor folici. Pe cale experimentală s-a demonstrat că acidul folic stimulează biosinteza acidului p-aminobenzoic de către microflora intestinală şi invers.

Conţinutul acidului p-aminobenzoic din unele produse alimentare se prezintă în tabelul 15.1.

După cum rezultă, din tabelul 15.1, bogate în PAB sunt drojdiile, varza uscată, rinichii, ficatul de porc, sparanghelul, germenii de grâu etc. Conţinutul acidului p-aminobenzoic sub formă legată, exprimat în μg% din unele enzime se prezintă astfel: 19 în catalaza extrasă din ficat de porc, 23—25 în extractul de muşchi de iepure, 13 în fosforilază, 130 în polipeptidază extrasă din drojdie, 19 în renină şi 21 în urează. În procesele enzimatice din pielea animalelor, PAB îndeplineşte rolul de coenzimă a sistemului melanogen. Mulţi cercetători au afirmat că PAB este coenzima tirozinazei.

Pentru obţinerea acidului p-aminobenzoic în stare liberă, sursele naturale trebuiesc în prealabil hidrolizate.

Scanned with OKEN Scanner

Tabelul 15.1

Conținutul în acid p-aminobenzoic al unor produse alimentare în μg/100 g

Produs	Conținut (μg/100 g)
Extract de drojdie	156
Drojdie de bere	6—61
Drojdie tulpina Brewer	9—59
Drojdie tulpina Baker	5,6
Varză uscată	14
Drojdie de panificație	5,6
Germeni de grâu	1,8
Ficat de porc	2,5
Rinichi	6,0
Sparanghel	2,0
Roșii	1,0
Mușchi de porc	0,6
Lapte praf	0,8
Lapte proaspăt	0,1
Grâu	0,25
Spanac	0,6
Cartofi	0,12—0,36
Morcovi uscați	0,43
Lucernă — făină	0,43

15.6. ABSORBȚIE, EXCREȚIE ȘI NECESITĂȚI

Acidul p-aminobenzoic în stare liberă se absoarbe ușor la nivelul intestinului subțire. Cel aflat sub formă de complexe suferă o hidroliză prealabilă sub acțiunea enzimelor digestive. După absorbție PAB trece în curentul sanguin, fiind distribuit în diferite organe și țesuturi. În cantitate mai mare se află în rinichi, ficat, mușchi, unde se află predominant sub formă legată de proteine. În sânge se află în cantitate mică, atât în stare liberă cât și legat de proteine transportoare.

Acidul p-aminobenzoic se elimină în special prin urină la adult 0,3—1,3 mg/zi, iar în cantitate mai mică prin fecale și transpirație. Administrat sub formă marcată (^{15}N) la iepure, PAB a fost rapid excretat prin urină. Se elimină sub formă de derivat acetilat și în special sub forma acidului D-aminohipuric (PAH). Nu este toxic.

Necesitățile în acid p-aminobenzoic pentru om și animalele superioare sunt asigurate prin hrană și mai ales de către microflora intestinală biosintetizantă.

La șobolan 0,75 mg vindecă acromotrichia provocată experimental. La șoarece 0,25 mg PAB previne depigmentarea părului. Puiul de găină crește bine dacă în 100 g de furaje se află peste 7,5 mg PAB. Totodată s-a remarcat că PAB determină o creștere a acidului folic în intestin.

Scanned with OKEN Scanner

15.7. ROL ȘI ACTIVITATE BIOCHIMICĂ

Acidul p-aminobenzoic este un factor de creștere pentru numeroase microorganisme *(Lactobacillus arabinosus, Escherichia coli, Acetobacter suboxidans* etc.). Unele microorganisme sintetizează PAB, în timp ce pentru altele se comportă ca inhibitor *(Mycobacter tuberculosis).* Are acțiune antagonistă față de sulfamide. Este sintetizat de flora intestinală în cantități suficiente pentru om și animale. PAB previne depigmentarea pielii și a părului. Se apreciază că PAB are o acțiune antiinfecțioasă generală. Este coenzima tirozinazei. Stimulează anabolismul substanțelor, fiind utilizat în tratamente de „reîntinerire", în geriatrie (gerovital, aslavital etc.).

Importanța mare a PAB rezultă din participarea sa în structura acizilor folici și folinici, precum și din rolul protector ce-l are asupra acizilor grași esențiali, adrenalinei, a vitaminelor A și E față de oxidare. Protejează pielea față de arsurile solare. Stimulează creșterea organismelor tinere. Dacă se administrează hrană fără PAB șobolanilor și puilor de găină se oprește creșterea acestora. PAB accelerează transformarea tirozinei (sub acțiunea tirozinazei) în pigmenți melaninici. În acest proces un rol însemnat îl are și acidul folic.

Acidul p-aminobenzoic este un activator al fenolazelor (fenol, p-crezol etc.). El intră în constituția multor sisteme enzimatice, chiar dacă nu îndeplinește la toate rolul de coenzimă. În aproape toate organele PAB se găsește la om și animale sub formă legată și foarte puțin sub formă liberă. Legăturile cu proteinele sunt foarte labile, ceea ce denotă că în complexe cu proteinele, PAB nu intră în structura lanțului polipeptidic. Legăturile cu proteinele se rup imediat înainte ca hidroliza proteinelor să se realizeze, ceea ce dovedește în mod convingător că PAB nu intră în constituția proteinelor.

În procesul de pigmentare a părului la animale și a penajului la păsări, PAB are un rol direct, participând efectiv la procesul de melanogeneză. Un mare număr de pigmenți se pot forma din tirozină, tiramină, 3,4-dihidroxifeniletilamină, N-metiltirozină etc. Sub acțiunea tirozinazei, fiecare din aceste substanțe formează melanine speciale.

Pigmentarea pielii prin expunerea la soare se datorește radiațiilor ultraviolete care au maxim de eficiență în jur de 297,5 mm. Pe baza cercetărilor efectuate s-a stabilit că și PAB în soluție prezintă un maxim de absorbție tot la 297,5 nm. În piele există o substanță care are un spectru de absorbție similar cu cel al acidului p-aminobenzoic și cu cel al spectrului de pigmentare a pielii. Prin iradiere cu raze UV, această substanță se degradează, iar compusul obținut produce eritem. Dacă se administrează o soluție de PAB injectată în piele, nu se produce nici o reacție adversă.

La pisica anesteziată, PAB determină o ridicare a tensiunii arteriale, datorită probabil acțiunii de protecție a oxidării adrenalinei.

În concentrații mai mari, PAB inhibă creșterea unor microorganisme ca *Pseudomonas morprunorum, Proteus vulgaris, Bacillus coli communis* etc. Pentru combaterea acestora PAB manifestă sinergism cu sulfamidele. O acțiune sinergică s-a remarcat și între PAB și penicilină în combaterea stafilococilor și a streptococilor. PAB manifestă acțiune inhibitoare și asupra creșterii rickettsiilor. PAB protejează animalele față

Scanned with OKEN Scanner

de intoxicația acestora cu diferiți toxici ca hidrochinona, compuși arsenicali (tri și pentavalenți), compuși de antimoniu, împotriva dozelor letale de acid arsanilic și a altor produse arsenicale antisifilitice.

PAB stimulează transformarea glicogenului în glucoză. Tratamente cu PAB determină creșterea hiperglicemiei la câine. PAB are caracter antioxidant și acțiune protectoare asupra ficatului, acizilor grași esențiali, carotenoidelor, vitaminelor A, E, K, F, adrenalinei etc. PAB contracarează efectul inhibitor al inozitolului asupra fertilității și a lactației la șobolan, având totodată o acțiune protectoare, antioxidantă asupra hormonilor steroidici. Administrarea de PAB la femele tinere, care în ultimii 5 ani au fost sterile, a avut efecte favorabile după 3—4 luni de tratament. Stilbestrolul împreună cu PAB este eficace în producerea ovulației, stimularea libidoului, intenstificarea tendințelor erotice. PAB inhibă activitatea colinesterazei și are o activitate antisulfamidică puternică. O moleculă de PAB poate să inhibe acțiunea a 5 000 molecule de sulfonamidă. Antagonismul PAB — sulfonamidă se datorește analogiei lor structurale. Singura deosebire între molecula PAB și cea a sulfonamidei constă în gruparea carboxilică de la PAB, care la sulfonamide este înlocuită cu gruparea sulfanil ($—SO_2NH_2$). Între PAB și sulfamide se produce o inhibiție competitivă de substrat. O parte din funcțiile biochimice ale acidului p-aminobenzoic se exprimă prin intermediul acizilor folici din componența cărora face parte.

15.8. HIPOVITAMINOZE ȘI HIPERVITAMINOZE

In stări de avitaminoză PAB se produce încetarea creșterii, în special la șobolani și pui de găină, decolorarea și căderea părului. Avitaminoza experimentală se poate realiza prin carență alimentară și în special prin administrarea de sulfamide, antivitamine, diferiți inhibitori al florei intenstinale generatoare de PAB.

In stare carențială, șoarecii și șobolanii își modifică culoarea blănii, care din neagră devine argintie, datorită unor tulburări metabolice ce intervin la nivelul pielii. Încărunțirea părului (caniția) la om este considerată de unii cercetători ca un simptom automat al declinului metabolic, datorat îmbătrânirii. Alții susțin că acest proces are un caracter funcțional și nu depinde de alterarea generală a funcțiilor organismului, întrucât se produce înălbirea părului și la oamenii tineri. De asemenea la unele animale se produc variații sezoniere ale culorii blănii.

Modificările pigmentare la animale și chiar la om rezultă însă nu numai din lipsa PAB ci și din absența din hrană a acidului pantotenic, a biotinei, a elementelor Fe, Cu, Mn, precum și influențelor hormonale. Carența PAB are drept rezultat încetarea depunerii de melanină la nivelul tubului pilos și al pielii. Administrarea de hidrochinonă, feniltiocarbamidă, 2,2'-azonaftalen, o-aminoazotoluen etc. la animalele cu blană colorată determină decolorarea acesteia. Dacă animalele cu atromotrichie provocată primesc PAB, blana acestora își recapătă culoarea naturală.

Procesul de acromotrichie este determinat de trei factori principali: acid pantotenic, acid folic și de PAB. Acidul p-aminobenzoic stimu-

Scanned with OKEN Scanner

lează biosinteza acidului folic și a biotinei de către microflora intestinală. Rolul de activator al acidului p-aminobenzoic asupra tirozinazei și a fenolazelor, demonstrat și „in vitro", arată rolul important și direct al PAB în metabolismul pielii și al bulbului pilos și nu numai prin intermediul acizilor folici.

Nu s-au semnalat cazuri de hipervitaminoze PAB.

15.9. ANTIVITAMINE ȘI RELAȚII INTERVITAMINICE

Sulfonamidele constituie cele mai importante antivitamine ale acidului p-aminobenzoic, cu largi aplicații terapeutice în vindecarea unor boli provocate de diferite microorganisme. Antagonismul dintre sulfamide și PAB s-a pus în evidență și la șoarecele infectat cu meningococ. Dintre sulfamide fac parte sulfanilamida, sulfapiridina, sulfatiazolul, sulfadiazina etc.

PAB manifestă acțiune antagonică față de inozitol în lactația șobolanului albinotic. În timp ce inozitolul inhibă procesul de lactație, PAB restaurează lactația.

În tratamentele dermice și ale părului, PAB prezintă acțiune sinerrică cu acidul pantotenic și acidul folic. Aceeași acțiune sinergică se manifestă și în stimularea proceselor de creștere la șobolani, pui de găină, șoareci, iepuri etc.

PAB protejează vitaminele liposolubile, adrenalina și alți compuși de degradări oxidative, având un pronunțat caracter antioxidant.

15.10. INDICAȚII TERAPEUTICE ȘI FARMACOLOGICE

Acidul p-aminobenzoic se utilizează în tratarea bolilor alergice (urticarie, prurit, boala serului), în depigmentarea părului (încărunțire și acromotrichie nutrițională) în doze de 0,25 mg/zi, artrite reumatismale, boli dermatitice, în rickettiose, tifos exantematic etc. Dozele mari nu au efecte toxice.

Gerovital H_3 și Aslavital, așa după cum menționează D. Bedeleanu (1985), conțin ca principiu activ procaina-HCl, cu adaus de fosfor antiaterogen și activatori. Ele reprezintă medicamentele anabolice, eutrofic-regeneratoare, cu acțiune biocatalitică celulară, de reglare a metabolismului lipidelor și colesterolului, cu efect lipotrop. Aceste produse farmaceutice au efect antiaterogen și de ameliorare a circulației cerebrale și a funcționării celulei nervoase. Produc vasodilatație coronariană și periferică. Se recomandă în prevenirea și tratarea formelor de îmbătrânire, predominant cerebrale și cardiovasculare, în astenia psihică și fizică, în surmenaj intelectual, tulburări de memorie și de concentrare a atenției, în stări depresive și de hiperemotivitate. Se folosesc frecvent în tratamentul aterosclerozelor, arterite, în prevenirea trombozelor, iar la copii în sindromul subdezvoltării psihosomatice.

Tratamentele cu PAB determină o scădere a leucocitelor în leucemiile acute, în ameliorarea activității intestinului gros și în vindecarea constipațiilor cronice. Tratamentele cu PAB au dat rezultate favorabile

Scanned with OKEN Scanner

în câteva cazuri de psihoză alcoolică, în alcoolism cronic și în obișnuința la morfină.

PAB se găsește în farmacii sub formă de pulbere, tablete, drajeuri și fiole. Tabletele conțin între 100—500 mg PAB, iar fiolele 100 mg sub formă de sare de sodiu. Fiolele trebuie păstrate la întuneric întrucât soluția primește cu timpul o coloratie galbenă și o anumită toxicitate.

In anumite scopuri terapeutice, dozele zilnice de PAB variază între 300 mg și 20 mg, în tratarea leucemiilor sau a tifosului exantematic. Medicamentele se administrează pe cale orală (tablete, drajeuri, capsule) și parentală (injecțiile). S-au preparat diferite creme și loțiuni care se aplică pe piele pentru prevenirea arsurilor, pentru protejarea pielii împotriva iradierilor solare intense și de mai lungă durată.

Scanned with OKEN Scanner

Capitolul 16. ALTE SUBSTANȚE CU ACTIVITATE VITAMINICĂ

16.1. COLINA 374
16.1.1. Considerații generale 374
16.1.2. Structură moleculară și analogi structurali 375
16.1.3. Izolare, sinteză și biosinteză 376
16.1.4. Proprietăți 378
16.1.5. Rol și activitate biochimică 379
16.1.6. Hipovitaminoze și hipervitaminoze 385
16.1.7. Antagoniști ai colinei 385
16.2. MEZOINOZITOL 386
16.2.1. Considerații generale 386
16.2.2. Structură 388
16.2.3. Absorbție și metabolism 390
16.2.4. Proprietăți, identificare și rol biologic 391
16.3. ACIZII LIPOICI 393
16.4. VITAMINA T 395
16.5. ACIDUL PANGANIC (VITAMINA B_{15}) 396
16.6. VITAMINA B_{14} 397
16.7. VITAMINA B_{13} 397
16.8. STREPTOGENINA 397
16.9. LIXOFLAVINA 398
16.10. VITAMINA B_8 398
16.11. VITAMINA B_7 398
16.12. VITAMINELE B_9, B_{10}, B_{11} 398
16.13. VITAMINA G 398
16.14. VITAMINELE L_1 și L_2 398
16.15. VITAMINELE R și S 398
16.16. VITAMINA H 398
16.17. AMINOACIZII și BAZELE AZOTATE 398

In decursul timpului, concomitent cu dezvoltarea mijloacelor de cercetare științifică, s-au descoperit numeroase substanțe considerate ca „*vitamine*", care însă pe măsura dezvoltării cunoștințelor în domeniul vitaminologiei s-a constatat că nu îndeplinesc toate condițiile pentru a fi numite vitamine, deși unele dintre aceste substanțe au în plante și animale o acțiune biochimică importantă. Unele din aceste substanțe se pot

Scanned with OKEN Scanner

încadra în grupa substanţelor *vitamere, vitagene* sau *a factorilor de creştere*, dintre care unii sunt identici cu alte vitamine descoperite anterior.

16.1. COLINA

16.1.1. CONSIDERAŢII GENERALE

Colina este clasată de unii autori printre substanţele care fac parte din complexul de vitamine B. După definirea mai clară a noţiunii de vitamine, numeroşi cercetători o încadrează în grupa substanţelor numite *vitagene*, deoarece participă la structura celulelor şi a ţesuturilor. Colina poate fi considerată ca o vitamină adevărată pentru unele organisme deoarece este indispensabilă unei bune dezvoltări a acestora, fiind necesar aportul ei exterior. Absenţa colinei din alimentaţie produce la şobolan inhibarea creşterii, depozitarea accentuată a lipidelor în ficat (ficat gras), degenerarea hemoragică a rinichiului, iar la puii de găină se produce încetarea creşterii oaselor şi apariţia perozisului, caracterizat prin malformaţii ale oaselor. Colina este un factor de creştere pentru numeroase microorganisme, în special pentru *Clostridium botulinum* şi pentru pneumococi.

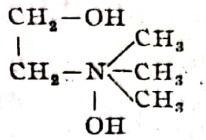
Colina se cunoaşte din 1867, când s-a reuşit sinteza sa din trimetilamină tratată la cald şi presiune cu clorhidrina etilenului. Rolul biochimic al colinei a fost pus în evidenţă în jurul anului 1924, când s-a remarcat că pancreatectomia efectuată la câini, determină o infiltraţie grasă a ficatului, hemoragii la rinichi şi creşterea conţinutului de acizi graşi în sânge de 10—15 ori faţă de nivelul acestora la câinii sănătoşi. Aceste afecţiuni care apar în urma pancreatectomiei nu se vindecă prin adminstrarea de insulină, ci numai prin hrănirea animalelor cu pancreas crud sau cu gălbenuş de ou. Pe baza analizei compoziţiei gălbenuşului de ou s-a stabilit că efectul său curativ în astfel de afecţinni se datoreşte colinei prezente în structura ovolecitinei.

Colina a fost descoperită anterior în bilă de unde a fost izolată şi apoi purificată. Structura moleculară a colinei a fost stabilită mai târziu, fiind confirmată prin sinteza ei în laborator. După aproximatv 37 de ani de la descoperirea colinei în complexul „bios", s-a ajuns în 1938 la concluzia din partea unor cercetători, că ea se poate enumera printre vitamine, deoarece reprezintă un principiu alimentar necesar dezvoltării normale a organismelor animale. Rolul biochimic al colinei s-a pus bine în evidenţă când s-au cercetat dereglările funcţionale ale pancreasului, care sunt frecvent însoţite de infiltraţia grasă a ficatului şi pot fi tratate eficient prin administrarea de lecitină sau de injecţii cu colină.

Scanned with OKEN Scanner

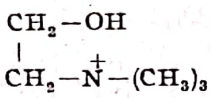
16.1.2. STRUCTURĂ MOLECULARĂ ŞI ANALOGI STRUCTURALI

Formula moleculară a colinei este $C_5H_{15}O_2N$, iar cea structurală corespunde denumirii chimice de β-hidroxietiltrimetilamoniumhidroxid sau de hidroxid de trimetil-β-hidroxietilamoniu



β-hidroxietiltrimetilamoniumhidroxid

Colina conţine în molecula sa trei metili legaţi de un atom de azot cuaternar. În soluţie, se găseşte sub formă ionică.



Grupul hidroxil al colinei trebuie să fie liber sau uşor de eliberat pentru a se putea manifesta cât mai eficient activitatea vitaminică a colinei. Eterii colinei sunt în general inactivi, în timp ce sărurile colinei sunt active. Aldehida betainei (colinei) este de asemenea activă. Azotul colinei poate fi înlocuit cu fosfor şi arsen, fără ca activitatea biochimică a produşilor obţinuţi să se modifice simţitor. Dintre derivaţii colinei care au aceeaşi activitate biochimică ca şi colina în tratarea ficatului gras şi a hemoragiilor renale, fac parte trietilcolina $(C_2H_5)_3-\overset{+}{N}-CH_2-CH_2-OH$, arsenocolină $(CH_3)_3-As(Cl)-CH_2-CH_2-OH$, dietilmonometilcolină $(C_2H_5)_2-N(CH_3)-CH_2-CH_2-OH$, betaină $(CH_3)_3-\overset{+}{N}-CH_2-COOH$, betainaldehida $(CH_3)_3-\overset{+}{N}-CH_2-C(=O)H$, etc. Pe cale experimentală s-a pus în evidenţă existenţa unui număr mare de substanţe numite analogi biologici ai colinei, care au efecte biochimice similare colinei. Aceste substanţe previn şi vindecă tulburările metabolice care apar în carenţă de colină. Din această grupă face parte trietilcolina, care nu este un donator de grupări metilice, dar care „in vivo" asigură transformarea homocisteinei în metionină. Trietilcolina previne infiltraţia grasă a ficatului şi a hemoragiei degenerative a rinichilor la şobolani crescuţi cu o dietă deficitară în colină. Sărurile colinei, betainele şi metionina au acţiune biologică similară colinei. Toate aceste substanţe au o acţiune lipotropă, dar mai redusă decât a colinei. Derivaţii metil, dietili, cei cu grupări alchilice ai colinei, precum şi arsenoomologii colinei nu asigură o creştere normală a animalelor hrănite cu o dietă total lipsită de colină.

În tabelul 16.1 se prezintă diferiţi derivaţi ai colinei şi activitatea acestora exprimată în procente asupra creşterii unei tulpini de pneumococ de tip III, după *Chiosa* şi *Neuman*, 1955.

Scanned with OKEN Scanner

Tabelul 16.1

Derivați strueturali ai colinei

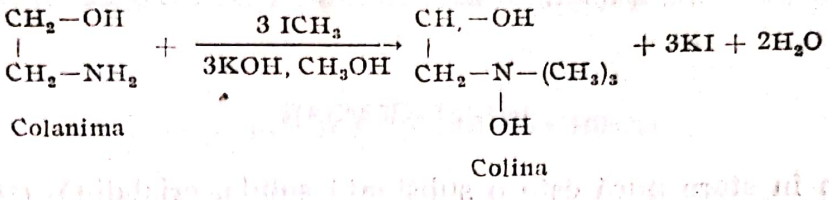
Derivați structurali	Activitate %
A. Substituiri la atomul de N	
Clorură de colină $(CH_3)_3-N-(Cl)-CH_2-CH_2-OH$	100
Dimetiletanolamină $(CH_3)_2-N-CH_2-CH_2-OH$	100
Metildietanolamină $CH_3-N-(CH_2-CH_2-OH)_2$	100
Clorură de trietilcolină $(C_2H_2)_3-N-(Cl)-CH_2-CH_2-OH$	100
Dietiletanolamină $(C_2H_5)_2-N-CH_2-CH_2-OH$	100
Clorură de dimetilhidrohietil amoniu $(CH_3)_2C_2H_5N(Cl)CH_2CH_2OH$	100
Etanolamină $H_2N-CH_2-CH_2-OH$	80
Dietanolamină $HN-(CH_2-CH_2-OH)_2$	95
Trietanolamină $N(CH_2-CH_2-OH)_3$	95
Hidroxid de tetraetanolamoniu $HO-N-(CH_2-CH_2-OH)_4$	85
N-acetiletanolamină $CH_3-CONH-CH_2-CH_2-OH$	23
B. Substituiri la atomul de carbon	
α-etiletanolamină $H_2N-CH-(C_2H_5)-CH_2-OH$	80
α-etil-α-hidroximetiletanolamină $H_2N-C(CH_2OH)-(C_2H_5)-CH_2-OH$	100
α-metil-α-hidroximetiletanolamină $H_2N-C-(CH_2OH)-(CH_3)-CH_2OH$	90
α,α-dimetilcolină (clorură) $(CH_3)_3-N-(Cl)-(CH_3)_2-CH_2-OH$	20
α,α-dihidroximetiletanolamină $H_2N-C-(CH_2OH)_2-CH_2-OH$	5
C. Substituiri la carbonul β	
γ-dietilaminopropanol $(C_2H_5)_2N-CH_2-CH_2-CH_2-OH$	100
β,γ-propandioldietilamină $(C_2H_5)_2N-CH_2-CH(OH)-CH_2OH$	100
Dimetil-β,γ-dihidroxipropilamoniu (clorură) $(C_2H_5)_2-CH_3-N-Cl-CH_2-CH(OH)-CH_2OH$	20
Clorură de acetilcolină $(CH_3)_3-N-(Cl)-CH_2-CH_2-O-CO-CH_3$	7
Acetil-β-metilcolină $(CH_3)_3-N-(Cl)-CH_2-CH(CH_3)-O-CO-CH_3$	7
D. Compuși inactivi la o concentrație de 50 ppm/cm³	
Fosforilcolină (sare de calciu) $(CH_3)_3-N(Cl)-CH_2-CH_2-OPO_3Ca$	—
Carbamilcolină (clorură) $(CH_3)_3-N(Cl)-CH_2-CH_2O-CO-NH_2$	—
Clorura uretanului de β-metilcloină $(CH_3)_3-N(Cl)-CH_2-CH(CH_3)OCOC_2H_5$	—
β-metoxietanolamină $H_2N-CH_2-CH_2-O-CH_3$	—
Etilendiamina $H_2N-CH_2-CH_2-NH_2$	—
Glicocol H_2N-CH_2-COOH	—
Serină $H_2N-CH-(COOH)-CH_5OH$	—
Sarcozină $CH_3-NH-CH_2-COOH$	—
Carnitină $(CH_3)_3-N(OH)-CH_2-CH(OH)-CH_2-COOH$	—
N-feniletanolamină $C_6H_5-NH-CH_2-CH_2OH$	—

16.1.3. IZOLARE, SINTEZĂ ȘI BIOSINTEZĂ

Colina liberă se extrage din produse naturale în mediu apos. Separarea acesteia de alți compuși și purificarea ei se face prin metode cromatografice. Colina existentă în complexe proteice, fosfolipide, acetilcolină etc., se extrage în urma hidrolizei produselor naturale în care se găsește. Hidroliza se face la cald în mediu acid.

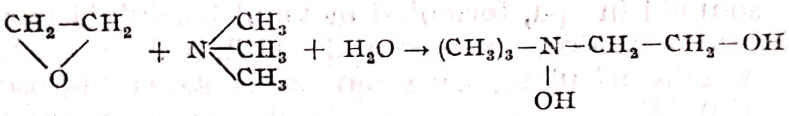
Scanned with OKEN Scanner

Colina se sintetizează în laborator prin metilarea colaminei cu iodură de etil, în soluție metanolică de hidroxid de potasiu.



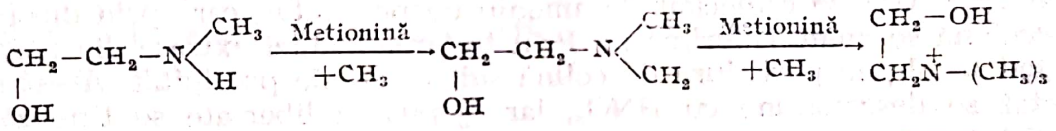
Colanima — Colina

Pe cale industrială colina se prepară din trimetilamină și oxid de etilen, în mediu apos.



Oxid de etilen — Trimetilamină — Colină

Biosinteza colinei se realizează în organismele vegetale și animale prin metilarea diferiților compuși endogeni, ca etanolamina, metilaminoetanolul, dimetilaminoetanolul etc. Ca donor de grupări metil se folosesc frecvent metionina. Schema sumară a biosintezei colinei la puii de găină se prezintă astfel:



Metilaminoetanol — Dimetilaminoetanol — Colină

La păsări, etanolamina nu poate fi metilată cu ajutorul L-metioninei, dar mono și dimetilaminoetanolul sunt ușor metilate de metionină.

Dintre precursorii colinei, cobaiul poate folosi numai dimetil-aminoetanolul, în timp ce suinele nu utilizează acest compus în procesul de biosinteză a colinei.

Majoritatea microorganismelor biosintetizează colina și nu au nevoie de aportul ei din exterior sau de prezența sa în mediul de cultură. Colina este biosintetizată și de plante. La *Cicer arietinum* conținutul maxim de botină se realizează după 96 ore de la germinarea boabelor. Biosinteza colinei este stimulată de ioni de potasiu, amoniu, de nitrați, precum și de compuși care posedă grupări metilice cum sunt: timina, metionina, creatinina, nicotina, betaina, sarcozina, precum și substanțele generatoare de grupări metilice cum sunt serina, metanolul, acetona. Grupările metilice se desprind ușor de substrat dacă sunt legate de atomi de azot sau de sulf. Substanțele acceptoare de grupări metilice (vitamina PP, colamina, nornicotina, glicocolul, homocisteina, homoserina etc.) inhibă biosinteza colinei.

Prin experiențe „in vitro" se consideră că biosinteza colinei se realizează în două etape, dacă se pleacă de la etanolamină. În prima etapă se realizează metilarea etanolaminei cu formare de dimetiletanolamină. Acest proces este stimulat de acizii folici, iar ca donor de metil se folosește metionina. În etapa a doua se realizează metilarea dimetiletanolaminei,

folosind ca donor de metil L-metionina sau serina, care prin decarboxilare trece în etanolamină, iar din gruparea hidroximetilică se poate obține metilul. Etapa a doua nu este stimulată de acizii folici.

16.1.4. PROPRIETĂȚI

Colina în stare pură este o substanță solidă, cristalină, cu masa moleculară 121, 13 UMA. În mod obișnuit se găsește sub formă de soluție incoloră, vâscoasă (siropoasă), deoarece este foarte higroscopică. Are o reacție net alcalină și formează cu ușurință săruri. Este o substanță higroscopică, ușor solubilă în apă, formol și metanol insolubilă în eter, benzen.

Din soluțiile alcoolice, în mediu de HCl, colina cristalizează sub forma unor cristale aciculare, care reprezintă sarea higroscopică a colinei ($C_5H_{14}ONCl$). Din amestecurile de alcool-eter, colina cristalizează sub forma unor plachete. Din soluțiile alcaline, colina se poate extrage numai cu alcool amilic, în care nu se dizolvă. Este o bază puternică care formează săruri cu metalele ușoare. La cald, în soluție diluată, sub 4%, colina este stabilă. La temperaturi mai mari, colina se descompune în trimetilamină și o aldehidă nevolatilă. Soluțiile acide sunt mai stabile. Clorura de colină este stabilă la încălzire. Ea nu se descompune nici la 180°C. Sărurile colinei sunt solubile în apă și alcool. Colina dă cu o soluție proaspătă de reineckat de amoniu un precipitat, care prin dizolvare în acetonă se poate colorimetra. Prin tratarea colinei extrase din țesuturi cu iod se obține periodura de colină sub formă de precipitat. Acest precipitat se descompune cu HNO_3, iar I_2 pus în libertate se titrează cu $Na_2S_2O_3$.

Metoda microbiologică se bazează pe stimularea creșterii unei tulpini mutante de *Neurospora crassa* (fără colină).

Colina se găsește în organismele vegetale, animale și în diferite microorganisme în stare liberă, înglobată în lecitină și alte fosfolipide și sub formă de acetilcolină. Cea mai mare cantitate de colină se află în stare combinată. Astfel, în ficatul de bou numai 2% se găsește sub formă liberă. În bobul de grâu peste 75% din colină se găsește în germeni. Untul, grăsimea și uleiurile vegetale sunt aproape lipsite de colină. Făina de grâu conține 50% din cea existentă în bob. Laptele este sărac în colină. Conținutul colinei în unele produse naturale, exprimat în mg/100 g se prezintă astfel: 660 în ficatul de vacă, 350 în ouă, 100 în cartofi, 100 în carne de vacă, 15 în lapte de vacă, 30 în bobul de grâu, iar în drojdia de bere 0,2—1,2 mg/100 g.

Absorbția colinei se face la nivelul intestinului subțire. Complexele cu biotină se hidrolizează sub acțiunea enzimelor digestive. După absorbție colina și fosfolipidele se deplasează prin curentul sanguin la ficat care reprezintă principalul organ de depozit. În limfă cantitatea de fosfolipide este foarte mică. În sângele omului adult cantitatea de fosfolipide reprezintă 4—8%. La câine cantitatea de colină liberă din sânge este de 1,5 mg. Lecitinele sunt transportate de plasmă, iar sfingolipidele, care au un rol structural, sunt transportate de către globuline.

Colina se elimină prin urină, fecale și prin transpirație. Omul adult elimină 10 mg pe zi.

Scanned with OKEN Scanner

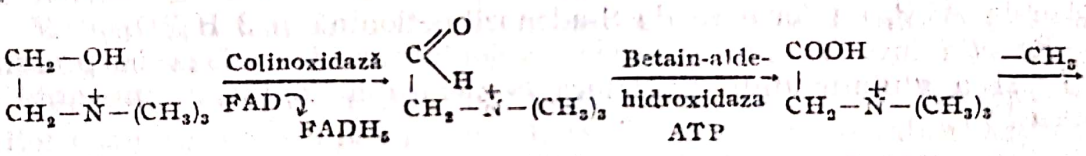
Necesitățile organismului uman pentru colină sunt de 1,5—4 g/zi la omul adult, la șobolan 100 mg/zi, la câini 35 mg/kg corp, la puii de găină 75 ml/zi. Dozele zilnice depind de conținutul în hrană a metioninei, betainelor, acizilor folici, vitaminei B_{12}, vârsta organismelor și starea lor de sănătate.

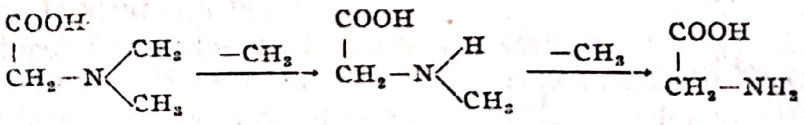
16.1.5. ROL ȘI ACTIVITATE BIOCHIMICĂ

Colina are un rol multiplu și complex în buna funcționare a organismelor animale și vegetale. Este un important donor de grupări metilice, participând astfel în numeroase procese metabolice, la biosinteza unor compuși cu rol biologic important. Este o componentă structurală a acetilcolinei, care reprezintă un important mediator chimic al impulsului nervos, fiind astfel implicată în buna funcționare a sistemului nervos. Colina este o componentă structurală a unor fosfolipide (lecitine, sfingomieline), fapt pentru unii autori nu o considera vitamină. Ea contribuie la transportul lipidelor în organism fiind un factor cu acțiune lipotropă.

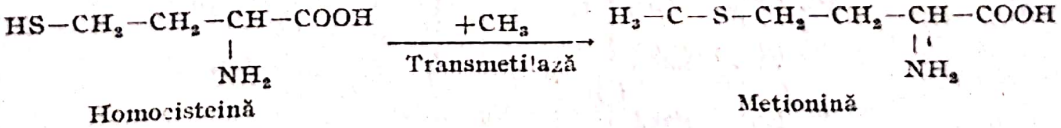
In componența acetilcolinei și a unor fosfolipide, colina participă cu molecula întreagă, acțiunea ei în acești compuși nu poate fi substituită de alți analogi biologici. Funcția de donor de grupări metilice poate fi însă îndeplinită și de alți compuși metilici (metionină. betaină, creatină etc.)

a. **Donor de grupări metilice.** La om și la animale colina se transformă prin oxidare în betaină, care prin demetilare în prezența homocisteinei sau a altor acceptori de metil, se transformă în glicocol, conform următoarei scheme:





Homocisteina prin acceptare de grupări $—CH_3$ se transformă în metionină.

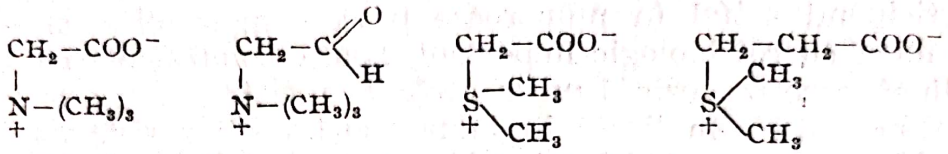


La șobolan, colina și betaina se transformă final în acid hipuric.

Transferul grupărilor metilice de la donori la acceptori se numește transmetilare și se realizează sub acțiunea unor enzime specifice numite transmetilaze. Gruparea metil, care poate fi direct transferată de la o substanță la alta, trebuie să fie o grupare metil labilă. Nu orice compus cu grupări metilice poate funcționa ca donor al acestor grupări. Labilitatea grupării $—CH_3$ este condiționată de locul în care se găsește în mo-

Scanned with OKEN Scanner

leculă, de legătura sa cu restul moleculei. Dacă $—CH_3$ se leagă de un atom de N sau de S ce conţin o legătură coordinativă liberă şi sarcină electropozitivă, atunci gruparea $—CH_3$ este labilă. Labilitatea metilului este condiţionată de fixarea sa de N sau S sub forma aşa numită combinaţie „oniu", amoniu dacă se fixează de N sau sulfoniu dacă se leagă de S. Labilitatea metilului este astfel condiţionată de fixarea sa de la un atom care câştigă prin această fixare o legătură covalentă adiţională şi o încărcare electrică pozitivă. Aceste substanţe cum sunt betaina, betainaldehida, dimetiltetina, dimetilpropriotetina, funcţionează ca donori activi de grupări metilice.



Betaina Betainaldehida Dimetiltetina Dimetilpropiotetina

Colina şi metionina deşi conţin grupări metilice, nu pot ceda direct gruparea metil în numeroase procese metabolice, decât numai după transformarea lor în betaină şi respectiv în „metionină activă".

In ţesuturile animale transformarea colinei în betaină se realizează sub acţiunea unui sistem enzimatic care conţine colinoxidază şi colindehidrogenază. Formarea metioninei este însoţită frecvent de o demetilare a betainei.

Metionina participă la reacţiile de metilare sub o formă specială denumită „metionină activă", în care gruparea metil este labilizată. Activarea metioninei se realizează prin legarea acesteia de adenozină din molecula ATP, cu formare de S-adenozilmetionină şi 3 H_3PO_4.

Reacţia are loc sub acţiunea metionintransadenozilaza în prezenţa Mg^{2+} şi a glutationului. Structura S-adenozilmetioninei se prezintă în figura 16.1.

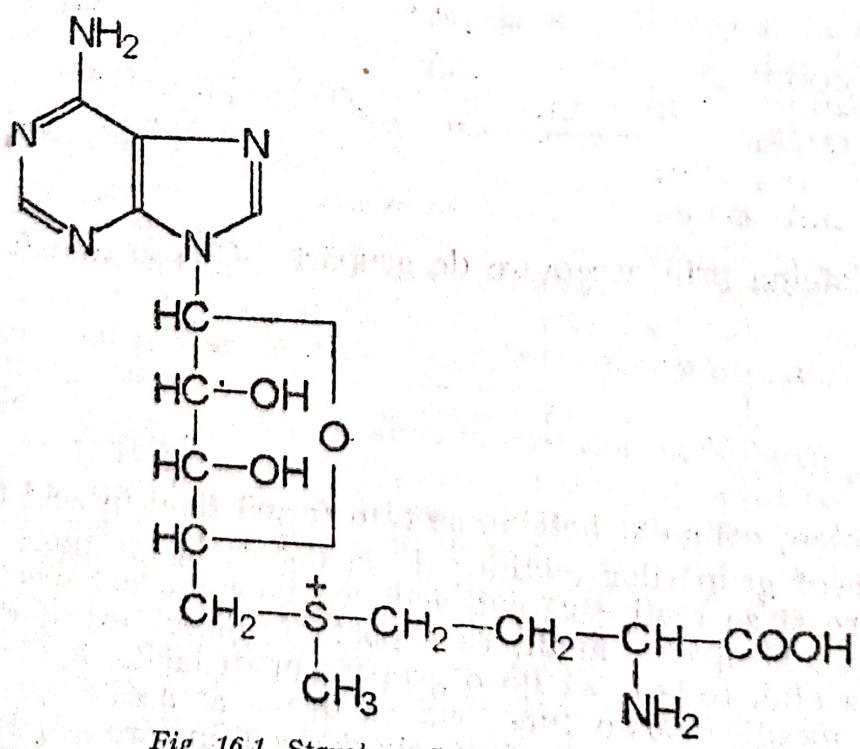
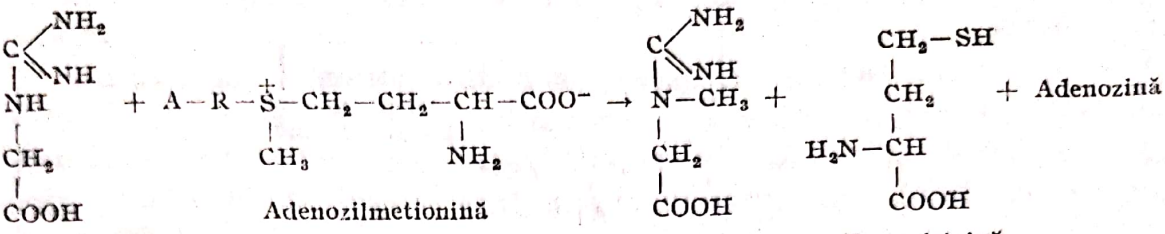


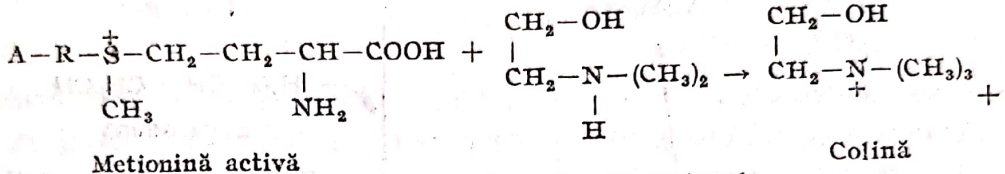
Fig. 16.1. Structura S-adenozilmetioninei

Scanned with OKEN Scanner

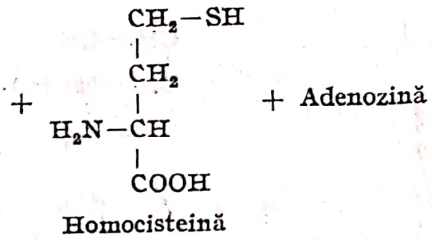
Transferul grupărilor metil active de la S-adenozilmetionină se face atât la acidul guanidinacetic pentru obținerea creatinei, cât și la precursorii colinei pentru biosinteza acesteia.



Acid guanidinacetic — Adenozilmetionină (A = adenozină, R = riboză) — Creatinină — Homocisteină



Metionină activă — Dimetilaminometanol — Colină

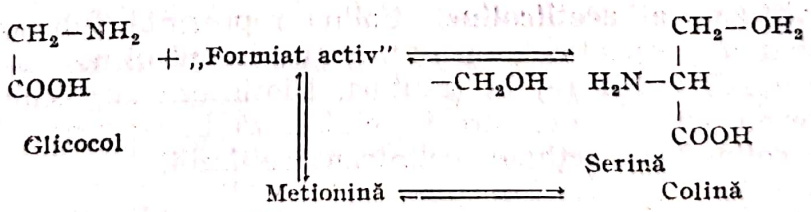


Homocisteină

Metionina activă se utilizează și la metilarea colaminei și a metilaminocolaminei.

Grupările metilice active pentru biosinteza colinei, a metioninei și a altor compuși metilici pot proveni și de la alte substanțe sub forma unor „untăți C_1" transportate ca „formiat activ". Acest proces este activat de acizii folici și de vitamina B_{12}.

Cu ajutorul izotopilor radioactivi s-a stabilit că glicocolul se poate transforma prin formilare în serină, iar aceasta se poate utiliza în reacțiile de metilare, ^{14}C din gruparea sa hidroxilică s-a identificat în metionină și colină.



Glicocol — Serină — Metionină — Colină

Corelațiile metabolice dintre principalele substanțe care îndeplinesc rolul de donori și acceptori de grupări metilice se prezintă în fig. 16.2.

La plantele de tutun, nornicotina prin metilare se transformă în nicotină, în prezența colinei, ca donor de grupări metilice. Colina funcționează ca donor de grupări metil în procesul de biosinteză a numeroase substanțe, inclusiv al metioninei și creatinei. Colina, metionina și creatina sunt intercorelate prin mecanismul de transfer al grupării metil.

Scanned with OKEN Scanner

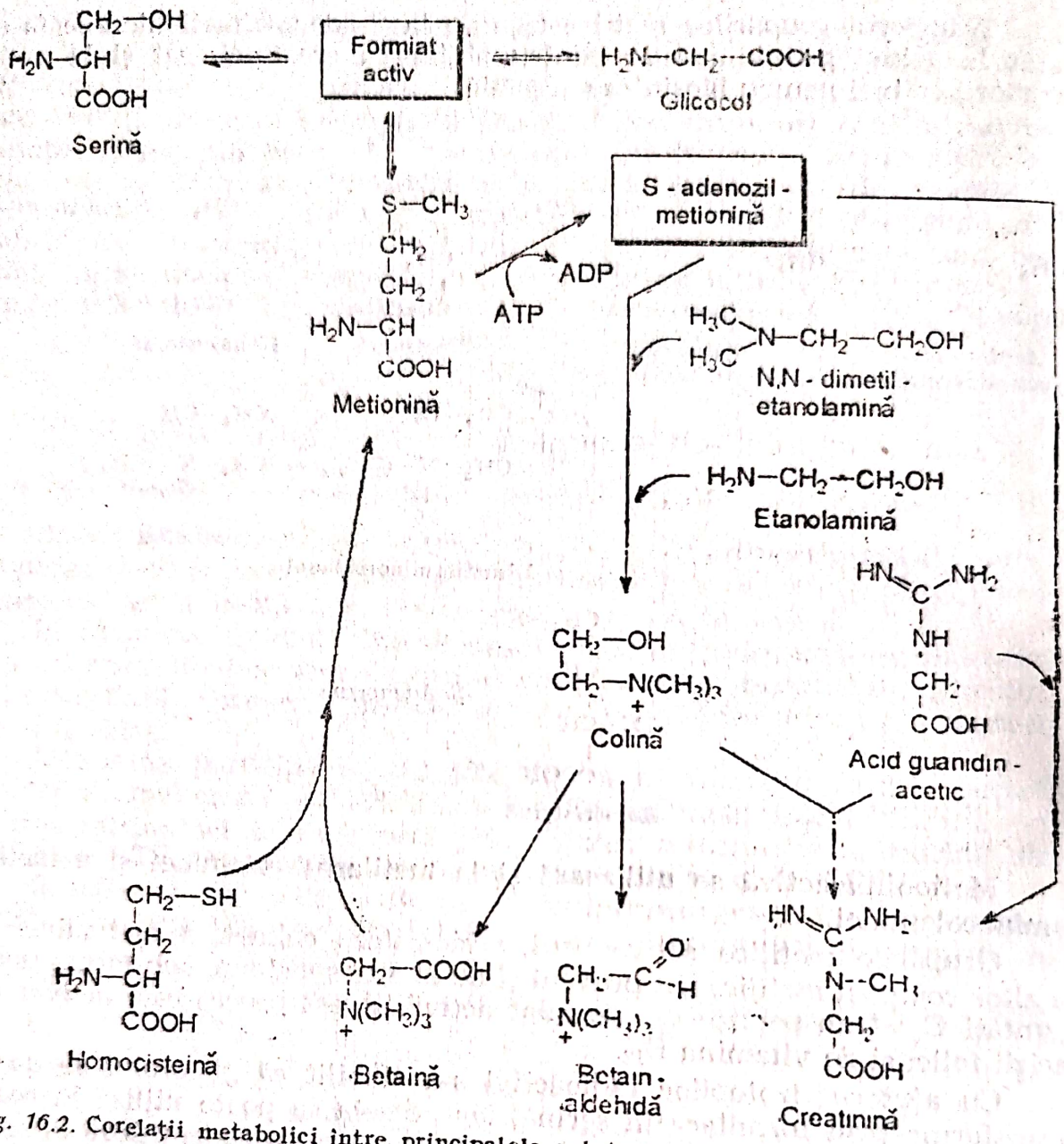
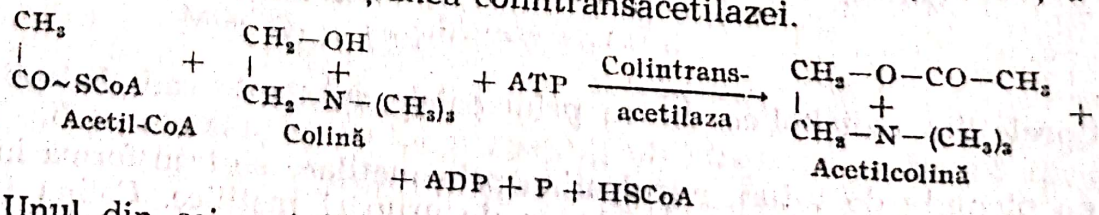


Fig. 16.2. Corelații metabolici între principalele substanțe care îndeplinesc rolul de donoși acceptori de grupări metilice.

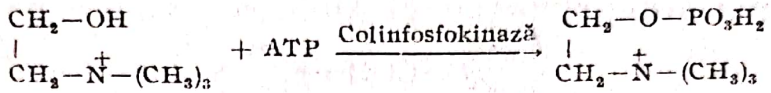
b. **Constituent al acetilcolinei.** Colina reprezintă substanța primară pentru formarea acetilcolinei, care transmite impulsul nervos de la ramificațiile nervoase (dendrite) la țesuturi. Biosinteza acetilcolinei este un proces puternic endergonic, care se realizează în prezența ATP, a acetil-CoA și a colinei, sub acțiunea colintransacetilazei.



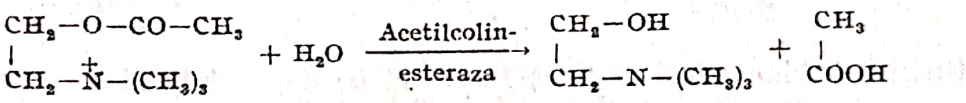
Unul din cei mai importanți donori de grupări acetil îl reprezintă acidul piruvic, care printr-o decarboxilare oxidativă în prezența NAD^+, acidului lipoic și a HSCoA se transformă în acetil-CoA.

Biosinteza acetilcolinei este stimulată de cisteină, acizii glutamic, lactic, citric, acetilacetic, de NAD^+, ioni de K^+, NH^+_4, rubidiu, dar este inhibată de ionii de cupru și mercur, precum și de monoiodacetatul de cistenă.

În țesuturi, alături de colină se găsește în cantitate mare și fosforilcolina, care poate să apară ca produs intermediar în procesul de biosinteză a acetilcolinei din colină. Ulterior s-a pus în evidență prezența colinfosfokinazei în drojdii, ficat, rinichi, intestin, care catalizează reacția de fosforilare a colinei.

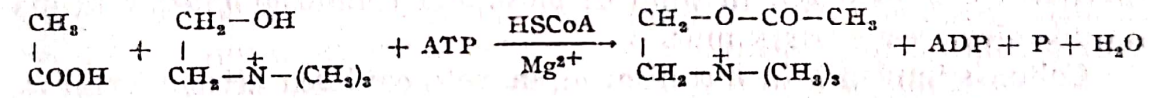


Acetilcolina este scindată hidrolitic de acetilcolinesteraza (enzimă care se găsește în cantitate mai mare în ganglioni și în sistemul imun), în colină și acid acetic. Reacția are loc cu o descreștere importantă a energiei libere.



Acetilcolina — Colina — Acid acetic

Acetilcolinesteraza (ACE) are o acțiune antagonică cu enzima de sinteză colinesteraza (CE), care catalizează formarea acetilcoenzimei A din acid acetic în prezența ATP ca donor de energie și a cofactorilor NAD^+, HSCoA și a ionilor de magneziu



Acid acetic — Colină — Acetilcolină

Acetilcolina (ACE) este inhibată de ezerină, prostigmină și de diizopropilfluorofosfat (DFP). Formarea acetilcolinei a fost demonstrată în țesutul cerebral, folosind ezerina ca inhibitor al colinesterazei (CE). Ezerina are astfel o acțiune de menținere a acetilcolinei în țesuturi (fig. 16.3).

c. **Funcția lipotropă a colinei.** Colina este o componentă structurală a lecitinelor, lizolecitinelor, sfingomielinelor, având un rol însemnat în transportul colinfosfolipidelor în organism. Lipsa colinei din alimentația șobolanului determină o acumulare de grăsimi în ficat. Administrarea de colină în starea carențială, oprește acest proces, numit și acțiune lipotropă.

Rolul colinei în metabolismul lipidelor este în același timp plastic dar și funcțional. Biosinteza fosfolipidelor în ficat este favorizată de ingestia de colină, betaină și metionină.

In absența colinei, ficatul animalelor este infiltrat cu grăsimi, majoritatea de natură endogenă, formată din glucide. În lipsa colinei, transportul acizilor grași, sub formă de fosfolipide, din ficat în plasmă este

Scanned with OKEN Scanner

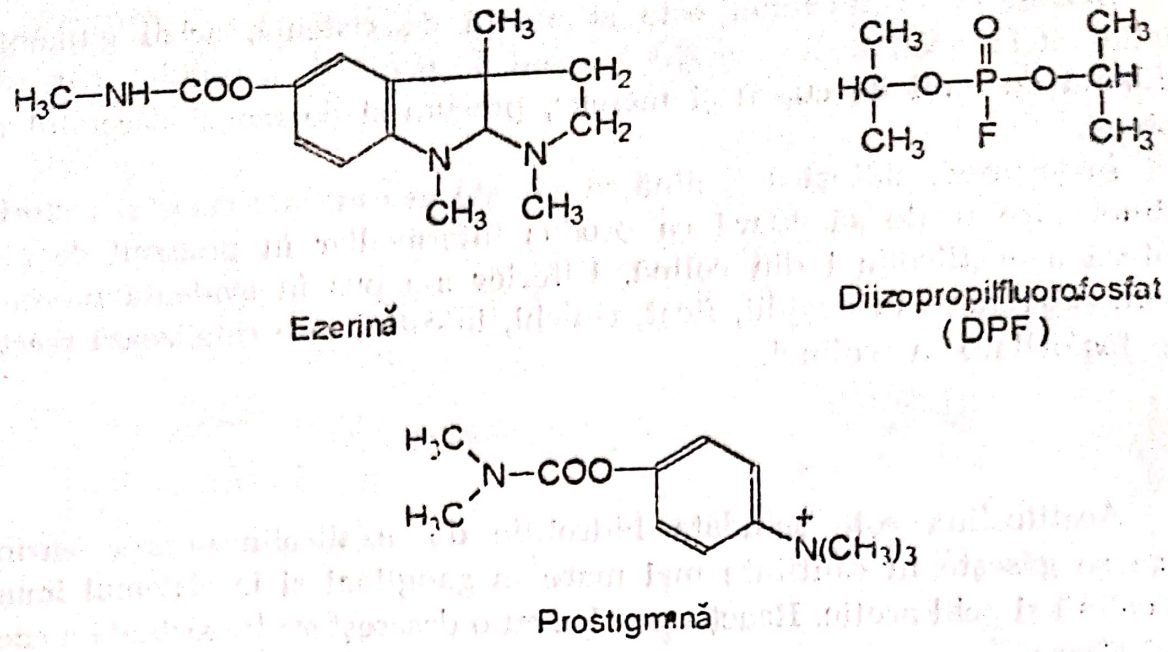


Fig. 16.3. Structura ezerinei, a prostigminei și a diizopropilfluorofosfatului

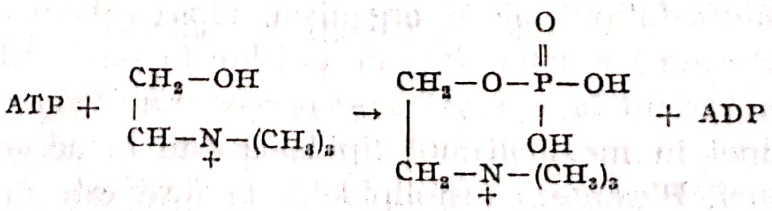
perturbat, inhibat, iar în ficat încep să se depună lipidele neutre. Dacă se adaugă în hrană colină, începe formarea de fosfolipide, iar depozitarea lipidelor neutre este îndepărtată. Crește de asemenea viteza de reînnoire a fosfolipidelor plasmatice. Metionina adăugată în hrană ameliorează simptomele carenței de colină.

La păsările hrănite cu o dietă săracă în proteine și acid folic scade activitatea colinoxidazei, în timp ce biosinteza colinfosfolipidelor în măduva oaselor crește foarte mult.

Colina stimulează în organismele animale oxidarea acizilor grași superiori și a colesterolului. Acțiunea lipotropă a colinei s-a remarcat nu numai în ficat ci și în rinichi, creier, inimă, splină etc.

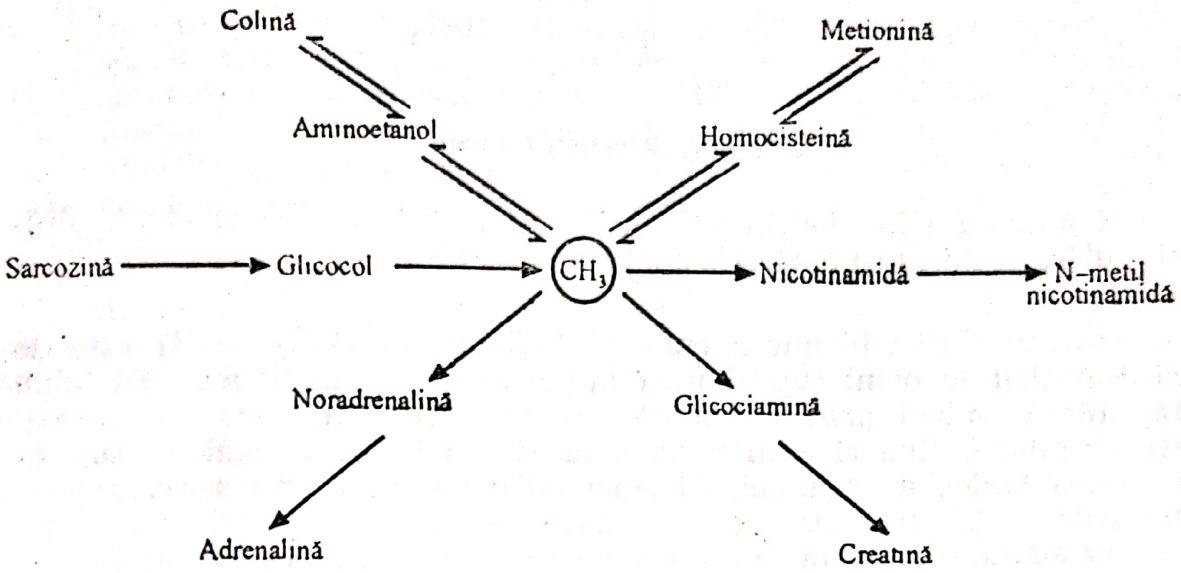
Experiența cu atomi marcați indică o participare directă a colinei în sinteza fosfolipidelor în organism, atât în stare liberă, cât mai ales sub formă de fosforicolină, CDP-colină sau CTP-colină.

In prezența extractelor de ficat, creier, intestin, colinfosfokinaza catalizează direct fosforilarea colinei și a precursorilor acesteia.



Colina, prin corelațiile metabolice care le are cu anumiți aminoacizi (metionina, serina, glicocol, homocisteina), participă la metabolismul proteinelor.

Relațiile care apar în procesul de metilare între colină și alți compuși, prin intermediul procesului de transmetilare, schematic se prezintă astfel:



Colina constituie un factor de creștere absolut necesar pentru unele microorganisme *(Clostridium botulinum,* pneumococi etc.).

Rolul colnei în organismele vegetale este puțin cunoscut deși plantele conțin cantități relativ mari de colinfosfolipide.

16.1.6. HIPOVITAMINOZE ȘI HIPERVITAMINOZE

Experimental s-a demonstrat că puii de găină, rațele, cobaii, iepurii și câinii au nevoie de un aport exterior permanent de colină. Insuficiența colinei în hrana animalelor determină o infiltrație grasă a ficatului, ciroză, degenerarea hemoragică a rinichilor, depresia funcției nervilor, perturbarea lactației și în unele cazuri dezvoltarea unor stări de paralizie la animale. Aceste dereglări se accentuează dacă hrana administrată animalelor este săracă și în metionină sau dacă conține multă cisteină. La șoareci apare și o anemie moderată și distrofie musculară, însoțite de creșterea nivelului creatinei în urină. Carența de colină se poate datora și otrăvirilor cu seleniu, care stimulează excreția colinei sub formă metilată.

16.1.7. ANTAGONIȘTI AI COLINEI

În cantități mici, *clorura de trietilcolină* $(C_2H_5)_3\overset{+}{N}\text{-}CH_2\text{-}CH_2\text{-}OH)\ Cl^-$ este toxică pentru șoarece, dar acțiunea sa este suprimată de clorura de colină. La fel se comportă și β, β-*dimetilcisteina* $(HS\text{-}C(CH_3)_2\text{-}CH(NH_2)\text{-}COOH)$, care inhibă creșterea normală la șobolanul alb.

Arsenocolina $(CH_3)_3\text{-}As\text{-}(Cl)\text{-}CH_2\text{-}CH_2\text{-}OH)$ poate înlocui colina în biosinteza fosfolipidelor, dar nu și în procesele de transmetilare.

Scanned with OKEN Scanner

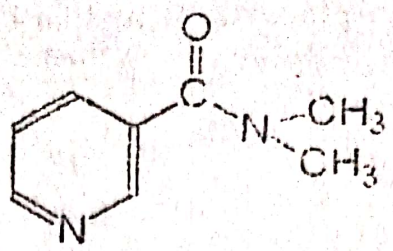


Fig. 16.4. Structura coraminei

Coramina (N,N-dietilnicotinamida (fig. 16.4) inhibă creșterea organismelor, acțiunea sa însă este suprimată de colină.

Etionina (S-etilhomocisteina C_2H_5-S-CH_2-CH_2-$\underset{\underset{NH_2}{|}}{CH}$-COOH) este toxică pentru șobolani supuși unei hrane sărace în metionină. Ea inhibă biosinteza colinei prin competiție cu metionina, cu care are analogie structurală. Colina și metionina adăugate în hrana animalelor suprimă acțiunea toxică a etioninei. Cisteina adăugată în hrană agravează tulburările metabolice care apar în stare de carență colinică.

O acțiune oarecum antagonistă se observă între colină și nicotinamidă, datorită probabil deplasării grupării metil pentru formarea N-metil-nicotinamidei, formă prin care nicotinamida se elimină prin urină.

Inozitolul reduce infiltrația grasă a ficatului la animalele aflate în carență colinică, dar nu are acțiune similară colinei la nivelul rinichilor.

Colina este relativ puțin toxică. La șoarece, doza letală medie (DL_{50}) este de 320 mg/kg greutate corp, administrată pe cale pantentală Dacă administrarea colinei se face pe cale orală, doza letală crește la 6,7 g/kg greutate corp. La câine, o doză de 8 mg/kg corp/zi de colină determină apariția unei anemii, iar la păsări dozele mari de colină administrate o perioadă îndelungată, provoacă tulburări de creștere. La oameni nu s-au semnalat cazuri de hipervitaminoză colinică, în afara cazurilor experimentale efectuate pe voluntari.

Colina se găsește în fiole în concentrație de 5—10% sub formă de clorură. Dozele utilizate variază în funcție de gravitatea afecțiunilor, fiind cuprinse între 10 și 60—70 mg zilnic, administrate intramuscular sau intravenos.

16.2. MEZOINOZITOL (MIOINOZITOL, FACTOR BIOS I)

16.2.1. CONSIDERAȚII GENERALE

Mezoinozitolul, inozitolul sau inozita a fost izolat sub formă cristalină de *J. Scherer* în 1850 din mazăre și straturile aleuronice ale semințelor de cereale. Ulterior s-a extras cu ocazia izolării creatinei din mușchiul cardiac, precipitând din soluțiile extractive cu alcool. În 1901, *Wildiers* extrage din complexul „Bios", o fracțiune căreia îi dă numele de „Factorul Bios I", cu rol de vitamină antialopecică. În 1928, *E. V. Eascott,* separă din ceai o fracțiune biologic activă pe care o numește bios I, punând astfel bazele cercetării rolului biologic al inozitolului. *D. W. Woolley* arată în 1940 că dintre cei nouă stereoizomeri cunoscuți

Scanned with OKEN Scanner

sub termenul generic de „inozitoli", numai mezoinozitolul este biologic activ. El asigură o creștere normală la șoarece și preîntâmpină căderea părului la animale. Inozitolii au formula generală $C_6H_{12}O_6$, fiind identică cu a hexozelor. Sub aspectul structurii chimice sunt polialcooli derivați din ciclohexan. Sunt ciclohexitoli sau hexahidroxiciclohexani. Sub aspect structural, din inozitol teoretic se pot forma 9 stereoizomeri. În natură apar numai 4 dintre aceștia: mezoinozitolul, D-inozitolul, L-inozitolul și silicitolul. Trei dintre acești izomeri sunt optic activi, datorită asimetriei moleculare. Mezoinozitolul este optic inactiv deoarece prezintă simetrie moleculară, dar numai el prezintă activitate vitaminică. Stereoizomerii inactivi nu inhibă activitatea mioinozitolului.

Mezoinozitolul sau mioinozitolul este un polialcool ciclic cu masa moleculară de 180,2 și cu structură hexaolciclohexanică, care se găsește larg răspândit în organismele vegetale, animale și în numeroase microorganisme, în stare liberă, sub formă de acid fitic, de fitină, care este sarea dublă de calciu și magneziu a acidului fitic, inozitofosfolipide (fig. 16.5). Formează de asemenea complecși cu fosfoproteine și lipoproteine.

În plante, inozitolul se găsește în special sub formă de ester hexafosforic și sărurile sale de Ca și Mg numite fitine, care sunt compuși normali ai țesuturilor parenchimatoase și a frunzelor. Sub formă de inozitofosfolipide se găsește în cantitate mai mare în frunze, semințe și în organismele animale.

Mezoinozitolul a fost izolat prima dată din țesutul muscular de unde îi derivă denumirea de mioinozitol. Este un constituent normal al tuturor țesuturilor vegetale și animale. Se găsește de asemenea sub forma sărurilor de Ca, Fe și Mg ale acidului fitic. Se crede că acidul fitic ar reprezenta o formă principală de depozitare a acidului fosforic, necesar dezvoltării plantelor. În semințe, inozitolul își mărește mult conținutul în timpul germinării acestora și poate în timpul formării lor, odată cu depunerea amidonului.

Mezoinozitolul este o componentă structurală a unor fosfolipide și a galactolipidelor din bobul de soia. Se găsește în cereale și sub formă de lipozitol, ce reprezintă un complex al monofosfoinozitolului cu galactoza, colamina, acizii oleic, cerebronic, palmitic, stearic și L(+)tartric. În timpul germinației, inozitolul se transformă în acid ribozofosforic și acid glucozodifosforic. Acidul ribozofosforic va contribui la biosin-

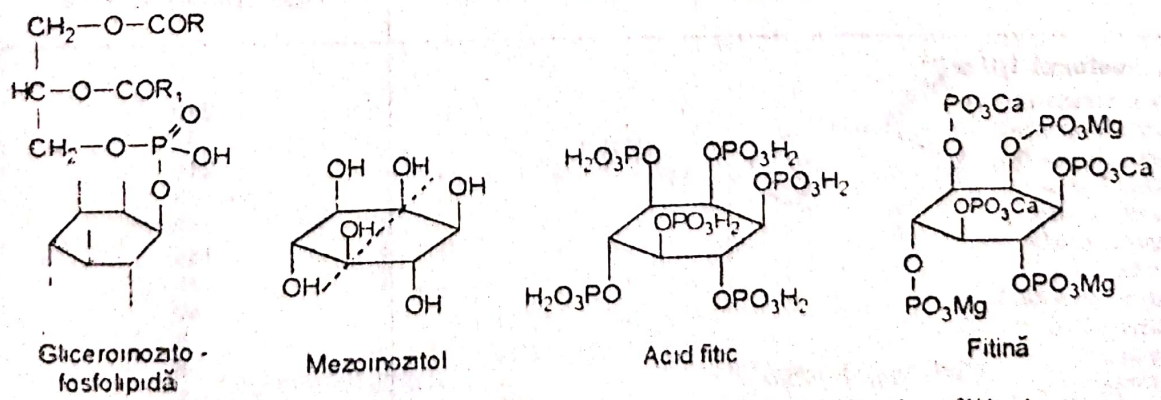


Fig. 16.5. Structura mezoinozitolului, a acidului fitic și a fitinei

teza acizilor ribonucleici. În organism, în special la nivelul intestinului, mezoinozitolul se combină cu tocoferolii, în special cu γ-tocoferolul și formează un eter care prezintă activitate vitaminică. Tot în timpul germinării semințelor acidul fitic pierde o cantitate din ce în ce mai mare de acizi fosforici, iar esterii inferiori contribuie la formarea acizilor nucleici. Ficatul este bogat în mezoinozitol sub formă liberă și sub forma unor combinații labile care pot ușor elibera mezoinozitolul în mediu apos. În mușchi mezoinozitolul se află în stare liberă, în eritrocitele nucleate sub formă de fitină, iar în plasmă sub formă de lipidinozitol. Din ficat și mușchi se poate extrage pe cale hidrolitică cu HCl, precipitare cu acetat de plumb și purificare cromatografică. Din fitină se poate obține prin hidroliză cu acid formic. Conținutul mezoinozitolului și al fosforului din fitină din unele produse se prezintă în tabelul 16.2.

16.2.2. STRUCTURĂ

Sinteza integrală a inozitolului a fost realizată în 1914 de Wieland, iar structura stereoizomerilor a fost stabilită mai târziu de către Pasternak.

După cum rezultă din formula structurală a mezoinozitolului, cei șase atomi de carbon ai săi nu sunt coplanari, iar grupările hidroxilice nu se găsesc în același plan al moleculei.

Tabelul 16.2

Conținutul în inozitoli și în acidul fosforic din fitină în unele produse alimentare, în mg/100 g s.u.

Produs	Conținut inozitol mg/100 g
A. Conținut în inozitoli	
Creier de vițel	200
Gălbenuș de ou	200
Creier de taur bătrân	81
Drojdie de bere	80—160
Mere	1—4
Produs	**Conținut fosfor mg/100 g**
B. Fosforul fitinei	
Orez nedecorticat	240
Orez decorticat	41
Porumb boabe	210
Grâu boabe	168
Ovăz boabe	182
Fasole boabe	154
Linte	93
Pâine integrală	87
Pâine albă	3
Cartof	6
Morcov	3

Scanned with OKEN Scanner

Mezoinozitolul poate fi obținut prin hidroliza acidă a fitinei, extrasă din frunzele arahidelor, unde se găsește în cantitate mai mare. Industrial, mezoinozitolul se poate obține din glucoză, conform schemei 16.6.

Descoperirea biosintezei mezoinozitolului la om s-a bazat pe observația că în urina diabeticilor, cantitatea de mezoinozitol excretată este mai mare ca cea ingerată. Aceeași observație s-a remarcat ulterior și la șobolani. S-a utilizat glucoză marcată cu ^{14}C, injectată intraperitoneal la șobolan și s-a remarcat ulterior prezența mezoinozitolului în ficat, mușchi, rinichi etc. Biosinteza mezoinozitolului în organismele animale este independentă de activitatea florei intestinale. Există dovezi că majoritatea bacteriilor pot biosintetiza mezoinozitolul, chiar și bacilul tuberculozei, la care au fost identificate inozitofosfolipide. *Proteus vulgaris* și *Pseudomonas fluorescens* biosintetizează mezoinozitol în cantitate de 1—2 mg/g s.u.

În general mezoinozitolul este biosintetizat de microorganismele gram negative, cu excepția speciei *Escherichia coli,* care nu sintetizează inozitoli. Bacteriile gram pozitive consumă inozitoli fără să aibă capacitatea de a-i biosintetiza. Excepție face și aici *Clostridium butilicum,* care produce cantități mici de inozitoli. Flora gram pozitivă din intestin consumă o bună parte de inozitoli produși de bacteriile gram-negative. În fructe și în semințe cantitatea de inozitoli este maximă în perioada premergătoare coacerii lor. În timpul coacerii, pe măsura acumulării de glucide, uleiuri, substanțe aromate, scade cantitatea de inozitoli. Toate plantele verzi conțin inozitoli sub formă liberă, derivați

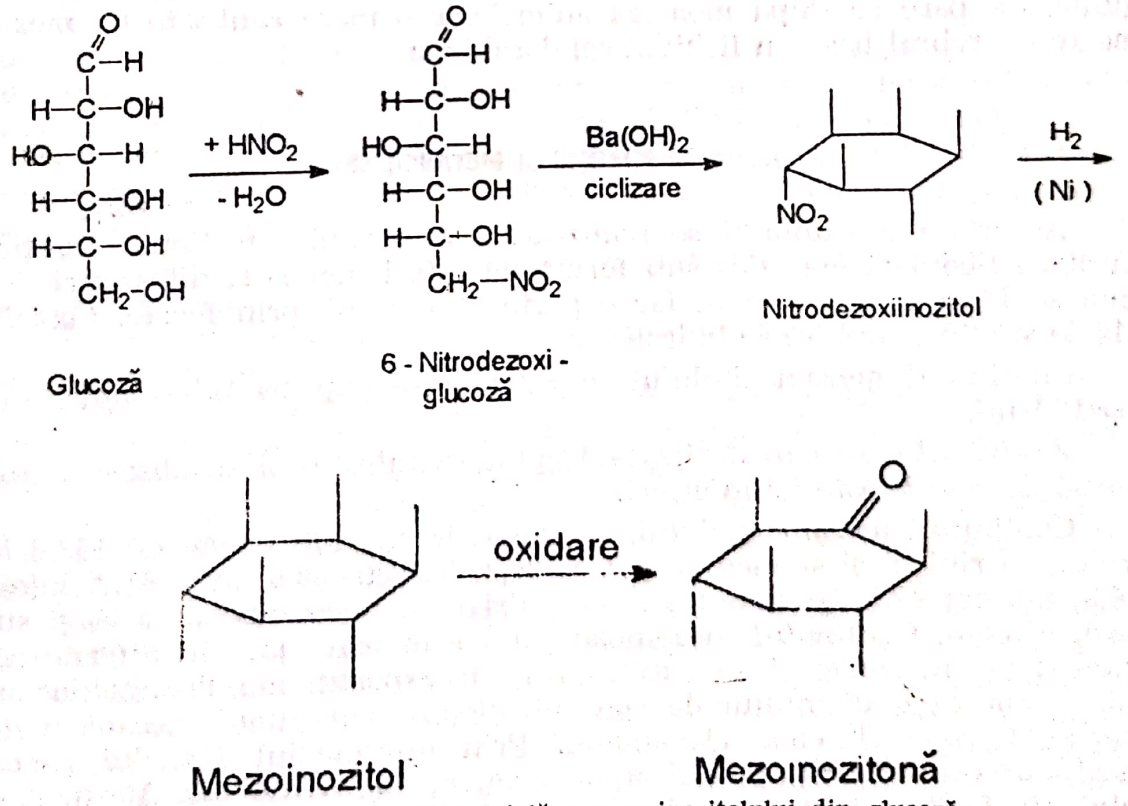


Fig. 16.6. Obținerea industrială a mezoinozitolului din glucoză

Scanned with OKEN Scanner

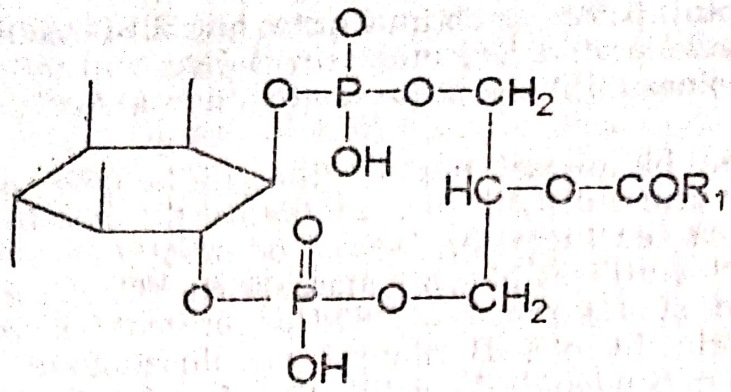


Fig. 16.7. Structura difosfoinozitidinei

fosforici, fitină și inozitolfosfolipide. La om și la animale flora intestinală biosintetizează cantități suficiente pentru necesități.

Din creierul de bovine s-a extras o fosfolipidă din care prin hidroliză alcalină s-a obținut difosfoinozitidina (fig. 16.7). În unele glicero-inozitolfosfolipide raportul dintre inozitol și acidul fosforic este de 1:1 (mazăre), dar în semințele de in între 1—2 și 1—4%. De asemenea, inozitolul poate fi substituit în unele fosfolipide de glucoză, galactoză, manoză, arabinoză etc. În organismele vegetale și animale s-au identificat inozitolmonofosfat, inozitoldifosfați, care pot contribui la biosinteza acizilor nucleici.

Unele organe, țesuturi și lichide biologice conțin mezoinozitol liber în cantități diferite. Astfel, în citoplasma celulelor din creier, cantitatea de mezoinozitol liber depășește de 10 ori pe cea din celulele hepatice și de 100 de ori cantitatea corespunzătoare din plasma sanguină. Se pare că după moartea animalelor o mare cantitate de mezoinozitol cerebral trece în lichidul cefalorahidian.

16.2.3. ABSORBȚIE ȘI METABOLISM

Absorbția inozitolului se realizează la nivelul intestinului subțire în stare liberă și mai ales sub formă de esteri mono- și difosforici. Fitina se hidrolizează parțial, iar o parte se elimină prin fecale. Fosfolipidele și alte complexe se hidrolizează.

Conținutul mezoinozitolului în sânge este cuprins între 0,37—0,76 mg/100 ml.

Acidul fitic se defosforilează treptat în intestin și se absoarbe sub formă de esteri fosforici inferiori.

Conținutul mezoinozitolului, exprimat în mg/100 g este de 162,6 în creier, în rinichi și stomac 126, ficat 86,4, testicul 68,9, ovar 61,2, inimă 54,9, mușchi 42,6. În mușchii mitocondriali și microzomi se află și sub formă liberă. Conținutul mezoinozitolului este mai mare în diferite organe decât în sânge și se explică prin transportul mezoinozitolilor în celule, contra gradientului de concentrație, pe baza unui mecanism de transport de Na^+ energodependent. Prin intermediul sângelui mezoinozitolul este distribuit la ficat, mușchi, creier, inimă etc. Mezoinozitolul din ficat se reface repede, are un conținut variabil. În creier, bio-

Scanned with OKEN Scanner

sinteza mezoinozitolului este mai lentă, dar concentrația se menține relativ constantă.

Dacă se administrează doze mici de 5 mg/kg corp pe animal, se observă că 20% din cantitatea dată se oxidează și se elimină sub formă de CO_2 și apă în 24 de ore, aproximativ 66% se transformă în glucoză și numai 5% se elimină prin urină. Restul inozitolului se depozitează în diferite organe și țesuturi sau intră în constituția unor celule și țesuturi.

Eliminarea mezoinozitolului se face prin urină în cantități mici, cuprinse între 12—56 mg/litru la adult și 8—30 mg/litru la copii. Aceasta se explică prin capacitatea mare de resorbție tubulară și prin existența unui „prag" plasmatic. Când acest prag este depășit sau când resorbția tubulară este diminuată se elimină cantități mari prin urină, ducând la un adevărat „diabet izonitolitic" (15—340 mg/l).

16.2.4. PROPRIETĂȚI, IDENTIFICARE ȘI ROL BIOCHIMIC

Mezoinozitolul este o substanță solidă, microcristalină, albă, fără miros, cu gust dulce, optic activ, cu punct de topire 222—225°C. Este solubil în apă, puțin solubil în alcool, practic insolubil în acetonă, cloroform, eter. Este sensibil la radiațiile UV, iar prin încălzire se transformă în furfurol.

Din soluțiile fierbinți și acid acetic cristalizează fără apă de cristalizare, dar în aceleași soluții la temperatură sub 50°C, cristalizează cu două molecule de apă. Inozitolul reduce soluția amoniacală de $AgNO_3$, cu formarea oglinzii de argint. Este stabil față de soluțiile diluate ale acizilor și bazelor.

Identificarea se poate face prin oxidare nitrică. În prezența azotitului de mercur, HNO_3 și a inozitolului, se obține un compus de culoare roșie-portocalie. Inozitolul cu apa oxigenată și sulfat feros dă o colorație albastră-violet, iar cu $KMnO_4$ sau H_2CrO_4 eliberează CO_2.

Dozarea mezoinozitolului se poate efectua cu periodat de sodiu în mediu acid sau cu $K_2Cr_2O_7$, respectiv arsenit de sodiu în exces și iodură de potasiu, prin titrare cu iod.

Metodele microbiologice urmăresc creșterea speciilor *Saccharomyces cerevisiae* și *Neurospora crassa*.

Testele biologice urmăresc vindecarea alopeciei la șoarecii carențați în mezoinozitol.

Izomidilul și derivații săi cu iod sau brom inhibă efectul de creștere al mezoinozitolului pe *Neurospora crassa*, iar γ-clor-ciclohexanul inhibă creșterea la *Saccharomyces cerevisiae*.

Esterii mezoinozitolului sunt vitaminic activi, la fel și fitina în tratamentul alopeciei. Acești compuși sunt însă inactivi sau cu activitate scăzută pentru creșterea unor microorganisme.

Între mezoinozitol și monoglucide apar strânse corelații metabolice. Glucoza contribuie la sinteza endogenă a mezoinozitolului, iar acesta sub acțiunea unei oxigenaze care are Fe^{2+} ca și cofactor, se transformă în acid glucuronic, care prin intermediul ciclului pentozofosforic poate contribui la formarea acidului ascorbic, a unor pentoze (xiloză, riboză, ribuloză etc.) sau să formeze esterul ribulozo-1,5-difosforic, substanță de bază în biosinteza glucozei.

Scanned with OKEN Scanner

Mezoinozitolul este un factor de creştere pentru numeroase bacterii, drojdii, ciuperci, plante şi animale. Stimulează creşterea la şobolan şi previne apariţia alopeciei. Carenţa mezoinozitolul la şobolan determină încetarea creşterii, apariţia de dermatite grave, căderea părului în jurul ochilor („ochi cu monoclu"), alopecie, scăderea lactaţiei etc. La animalele cu conţinut ridicat de fosfolipide se manifestă efecte antagonice faţă de colină. Administrat în cantitate mare, determină creşterea raportului P/N din lipidele hepatice, cu apariţia ficatului gras.

Mezoinozitolul în asociere cu acidul pantotenic vindecă alopecia, cu acidul p-aminobenzoic favorizează creşterea, iar cu α-tocoferolul înlătură encefalopatia la puiul de găină.

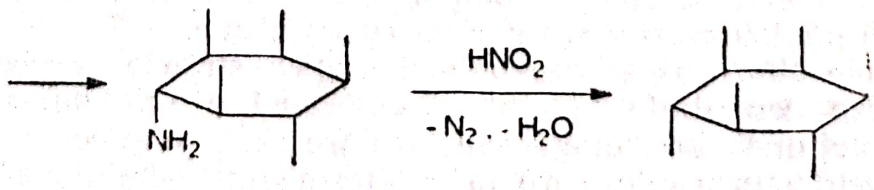
Mezoinozitolul intră în componenţa unor enzime ca amilaze, chimotripsină, fosfataza alcalină, renina, dar nu se cunoaşte rolul său în activitatea acestor enzime. În citosol s-au identificat fosfatidilinozitolkinaza, difosfo- şi trifosfoinozitolkinaza. Prin procese de fosforilare şi defosforilare ale inozitolului se asigură transportul prin membrane a ionilor de K^+ şi Na^+. Faţă de Ca^{2+} fosfoinozitolii manifestă o mare afinitate. Se pare că stimularea colinergică în ţesutul nervos intensifică scindarea hidrolitică a inozitofosfolipidelor din membranele celulare, proces care produce o depolarizare a membranelor şi declanşează potenţialul de acţiune (GROTO, 1977).

Pe cale experimentală s-a demonstrat că 18 tipuri de celule umane nu cresc în mediu semisintetic decât după adăugare de mezoinozitol, singurul izomer al inozitolului cu activitate biologică. Mezoinzitolul manifestă acţiune lipotropă, mai ales sub formă liberă sau de inozitofosfaţi, împiedicând depunerea grăsimilor şi a colesterolului în ficat. Stimulează transportul lipoproteinelor cu masă moleculară mică de la ficat în sânge, precum şi activitatea funcţiilor cardiace. Mezoinozitolul stimulează creşterea părului, diureza şi creatinuria. Părul de la persoanele cu chelie, conţine mai puţin mezoinozitol decât firul de păr normal.

Bacteriile metabolizează mezoinozitolul pe căi diferite. *Acetobacter suboxidans,* oxidează mezoinozitolul la mezoinozoză (fig. 16.8).

Alte microorganisme folosesc inozitolii ca principala sursă de carbon. La majoritatea animalelor, metabolizarea inozitolilor este analoagă cu a monoglucidelor, fapt ce reflectă înrudirea lor genetică şi structurală.

Alopecia care apare la şoarecii albi, după o perioadă de 30 de zile de la instalarea stării carenţiale în mezoinozitol se caracterizează prin căderea simetrică şi bilaterală a părului, urmată de apariţia dermatitelor în jurul ochilor, cu scăderea accentuată în greutate. Mezoinozitolul accentuează acţiunea lipotropă a colinei şi preîntâmpină infiltraţia grasă



Aminodezoxiinozitol Mezoinozitol

Fig. 16.8. Oxidarea mezoinozitolului la mezoinozitonă

Scanned with OKEN Scanner

a ficatului în carență proteică. Inozitolul diminuează alopecia determinată de lipsa biotinei și a acidului pantotenic. Unii autori susțin totuși că alopecia la șobolan apare și în prezența mezoinozitolului dacă în hrană lipsește acidul pantotenic și biotina, fapt ce reflectă acțiunea sinergică a acidului pantotenic, colinei și mezoinozitolului în prevenirea și tratarea alopeciei la șoarcei și șobolani. La om nu s-au putut corela până în prezent diferite simptome cu carența inozitolilor. Totuși, noile cercetări arată că la om inozitolul previne infiltrația grasă a ficatului, provocată de aportul excesiv de colesterol alimentar. Necesitatea aportului de mezoinozitol este dependentă de alimentație și biosinteza florei intestinale. Se apreciază ca necesar pentru omul adult 1 g/zi pentru 2 500 calorii alimentare. În unele cazuri patologice, crește eliminarea inozitolului prin urină, concomitent cu creșterea diurezei, apare așa numitul „diabet insipid". Nu se cunoaște o toxicitate ca atare a mezoinozitolului. Fitina, sub formă de hexafosfat de sodiu, este toxică pentru iepure, administrată oral în doză de 9,5 g/kg corp, iar dată intravenos în doză de 66 mg/kg corp.

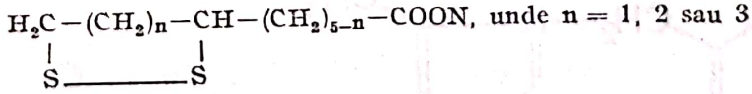
O relație metabolică importantă există între mezoinozitol și vitamina E în tratamentul unor afecțiuni la puii de găină. Experimental s-a demonstrat că lipsa γ-tocoferolului determină la puiul de găină encefalomalacie și diateză exsudativă, care pot fi însă prevenite de mezoinozitol. Forma activă a γ-tocoferolului este un eter al său cu mezoinozitolul, care se obține la nivelul intestinului subțire, produs obținut și prin sinteză.

În terapia umană, se întrebuințează esterii fosforici ai inozitolului și fitina administrată pe cale orală, deși o parte din această substanță nu se resoarbe. Dozele întrebuințate variază între 1—2 g/zi la adult.

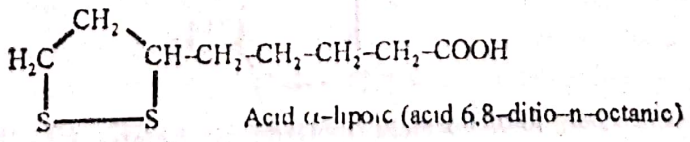
16.3. ACIZII LIPOICI (ACIZI TIOCTICI)

Acizii lipoici sunt factori de creștere pentru numeroase microorganisme de tipul bacteriilor lactice *(Lactobacillus casei), Streptococus faecalis* și protozoarul *Tetrahymena geleii.* Sunt de asemenea factori necesari decarboxilării acidului piruvic, de unde derivă și denumirea de *„factori de activare ai piruvatului"*.

Formula generală a acizilor lipoici este următoarea:

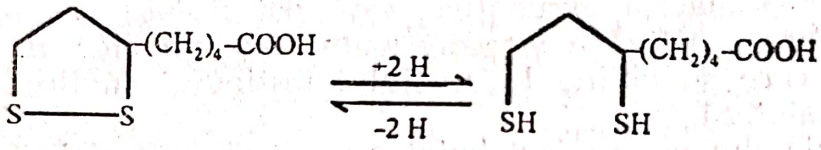


Acidul lipoic sau tioctic are n = 1 și este numit acidul α-tioctic sau 6,8-ditiooctanic. A fost obținut în stare cristalină în 1953 din extracte de ficat, de către *L. J. Reed* și *I. C. Gunsalus.* Posedă un inel pentagonal disulfidic și o catenă laterală formată din acidul valerianic:



Acid α-lipoic (acid 6,8-ditio-n-octanic)

Acidul α-lipoic este optic activ, dextrogir (+)97°, datorită asimetriei atomului C—6. Numai forma D este biologic activă. Prin sinteză s-a obținut forma racemică DL-acid lipoic, care prezintă 50% din activitatea acidului D-lipoic. Acidul α-lipoic are o largă răspândire în natură, atât în organimele vegetale, animale, cât și în microorganisme, de unde a fost izolat sub formă disulfidică și sub formă de sulfoxid, care reprezintă produsul său de oxidare chimică. Există în natură și sub forma aciclică (L<SH, SH), conjugat cu alte substanțe de care poate fi separat numai prin hidroliză. Activitatea biologică a acidului α-lipoic, denumit pe scurt acid lipoic, se datorește proprietății acestuia, ca de altfel a tuturor acizilor lipoici de a se transforma în mod reversibil din forma oxidată ciclic disulfidică (L<S—S), în forma redusă, aciclic ditiolică (L<SH, SH) având astfel un rol însemnat în procesele de oxidoreducere și în transportul pe cale neenzimatică a hidrogenului.



Acid lipoic
forma oxidată, disulfid

Acid lipoic
forma redusă, ditiol

Forma biologic activă a acidului lipoic este cea de conjugat cu tiaminpirofosfatul, sub formă de lipotiaminpirofosfat (LTPP), care reprezintă forma coenzimatică a acidului lipoic, activă în decarboxilarea oxidativă a acidului piruvic. Formula lipotiaminpirofosfatului se prezintă în fig. 16.9.

Acidul lipoic se leagă de tiaminpirofosfat covalent, printr-o legătură amidică formată prin reacția grupării sale carboxilice cu gruparea

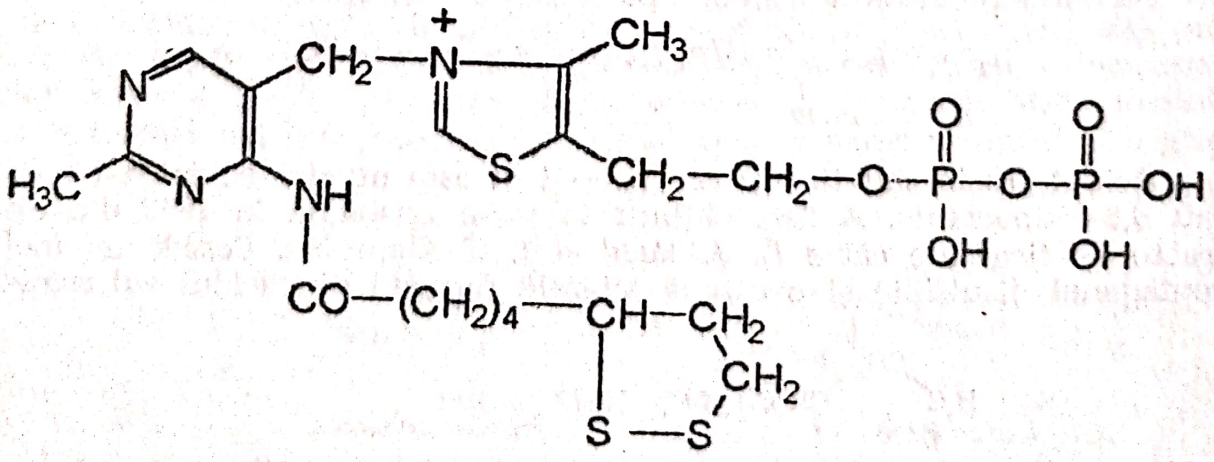
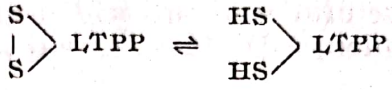


Fig. 16.9. Formula lipotiaminpirofosfatului

Scanned with OKEN Scanner

NH_2 legată de inelul pirimidinic al tiaminpirofosfatului. Acidul lipotiaminpirofosforic funcționează de asemenea ca sistem de oxidare-reducere, reversibil, conform relației:



Forma oxidată Forma redusă

Potențialul de oxidoreducere a acestui sistem este de —0,42 volți la pH=7. Reacția este catalizată de o dehidrogenază specifică, numită dehidrogenaza lipoică sau lipoildehidrogenază și necesită prezența NAD^+.

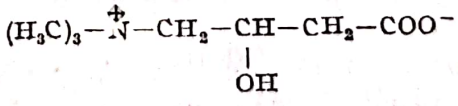
Acidul lipoic ia parte activă în procesul de decarboxilare a α-cetoacizilor, în procesul de fotosinteză și probabil în ciclul vederii, precum și în procesele de acetilare. Activitatea biochimică a acidului lipoic în aceste procese este corelată cu cea a tiaminei și a coenzimei A.

Acidul lipoic se găsește în toate alimentele și s-au semnalat stări carențiale naturale. Experimental carența lipoică se realizează prin administrarea de acid 8-metil-α-lipoic, care se comportă ca antivitamină. Acidul lipoic constituie un factor necesar pentru sistemele enzimatice cu vitaminele B_1, B_2 și PP. Se folosește în tratamentele afecțiunilor hepatice determinate de dereglarea metabolică a α-cetoacizilor.

16.4. VITAMINA T (CARNITINA)

Vitamina T, numită și torultină, termitină, novoina, factorul viermilor de făină, factor T complex etc., este un factor de creștere indispensabil viermelui de făină *Tenebrio molior*, de unde îi derivă numele de vitamina T. Este un factor de creștere pentru termite, insecte și pentru metamorfoza viermilor de făină. S-a izolat sub formă cristalină din ficat, drojdii, mușchi.

Sub aspect structural vitamina T este trimetilbetaina acidului β-hidroxi-γ-aminobutiric, fiind numită mai nou carnitină.



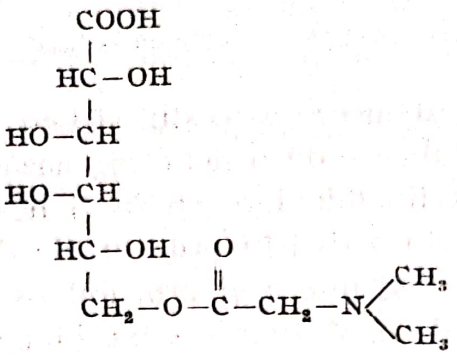
Carnitină

Este activă în concentrații de 0,37—0,75 μg/g aliment. Nu se cunoaște mecanismul său de acțiune, dar prin analogie cu betaina și colina, poate îndeplini rolul de substanță donatoare de grupări metilice, fiind deci un însemnat agent de metilare. Carnitina stimulează la om și animale secreția pancreatică, fiind o substanță pancreotropă.

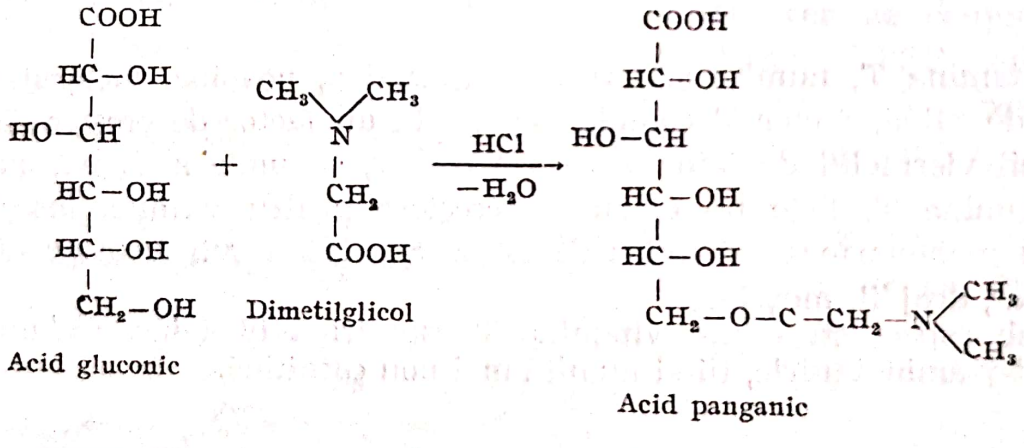
Scanned with OKEN Scanner

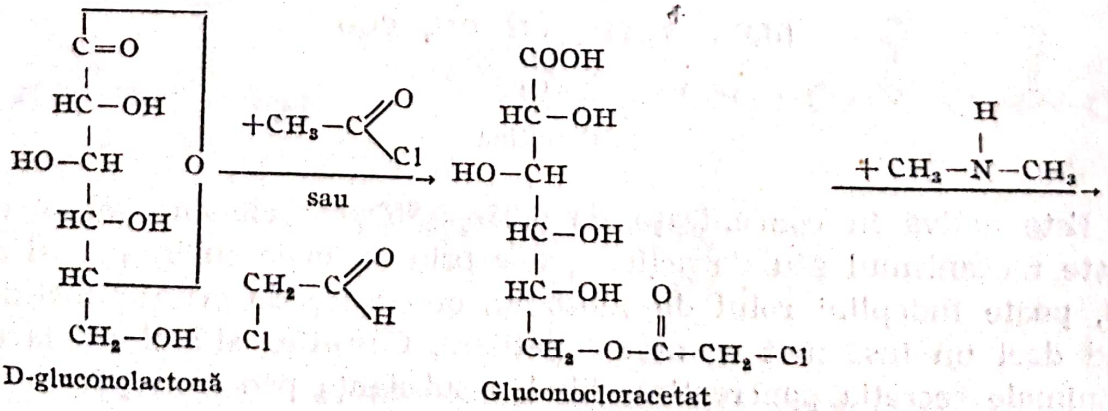
16.5. ACIDUL PANGANIC SAU VITAMINA B_{15} (Bio_{15})

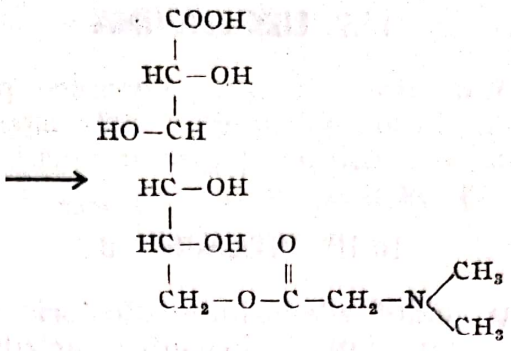
Acidul panganic se mai numește și vitamina B_{15}, pangametină, „Bio_{15}". Sub aspect structural este un acid d-gluconodimetilamino-acetat (sau o-(N,N-dimetilglicil)-6-D-gluconic, cu următoarea formulă:



A fost izolat de *E. T. Krebs* și colab. în perioada 1951—1952. Participă în sistemele oxidoreducătoare în componența unor enzime respiratorii. Stimulează sistemul hipofizo-suprarenal și are efecte de ameliorare a anorexiei celulare antiexudative și antihialuronidazice. Sarea de calciu a acidului panganic se prezintă sub forma unei pulberi amorfe, ușor solubilă în apă și insolubilă în alcool, eter, acetonă și în alți solvenți organici. Este stabilă în mediu acid și instabilă în mediu alcalin. Se obține prin sinteză pe două căi: fie prin condensarea acidului gluconic cu dimetilglicocolul, în mediu de HCl, fie din d-gluconolactonă, care tratată cu anhidrida acidului monocloracetic, trece în gluconocloracetat, care reacționează cu dimetilamina, rezultând acidul panganic.







Acid panganic

Nu se știe dacă prezența acidului panganic în sânge și în alte țesuturi este de origine endogenă sau este preluat din hrană.

Rolul acidului panganic este oarecum similar cu al colinei și carnitinei, deoarece conțin grupări metilice labile, care pot participa în reacții de metilare și transmetilare în celule. Are ca și colina o acțiune lipotropă, fiind utilizat în tratarea hepatitelor. Acidul panganic se pare că îndeplinește rolul de donor de grupări metilice în procesul de biosinteză a colinei, creatinei, adrenalinei, metioninei, sterinelor, hormonilor steroizi, sARN etc. Necesarul de acid panganic pentru adulți este de 2 mg/zi. Acidul panganic și unii derivați ai săi stimulează creatinogeneza și se recomandă în bolile cardiovasculare, reumatice și în migrene, fiind un bun vasodilatator. Prin administrarea de acid panganic se constată o creștere a γ-globulinelor, a creatinei și creatininei în sânge și urină și o diminuare a colesterolului și a acidului ascorbic. Acidul panganic activează respirația celulară și participă la procesele de detoxifiere a organismului intoxicat cu narcotice de natură barbiturică, precum în cazul otrăvirilor cu CCl_4, salicilat de sodiu, cortizon etc.

16.6. VITAMINA B_{14} (FACTOR DIN SER)

Are acțiune de stimulare a creșterii reticulocitelor „in vitro". Derivă probabil din xantopterină și acizi folici în urma unor transformări metabolice. Corectează anemia șobolanilor produsă de sulfatiazol. Este corelată funcțional cu acidul folic. Nu conține cobalt și a fost izolată din urina oamenilor sănătoși, în concentrație de 0,33 mg/l. Are rol în stimularea și proliferarea celulelor.

16.7. VITAMINA B_{13} (ACID OROTIC)

Reprezintă un factor de creștere pentru șobolan și găină. Este eficace în doze de 2 μg/zi la aceste animale. Este o componentă fluorescentă. Apare ca și compus intermediar în procesul de biosinteză a bazelor, nucleozidelor și nucleotidelor pirimidinice.

16.8. STERPTOGENINA

Este un factor de creștere necesar streptococului hemolitic. Are structură polipeptidică.

Scanned with OKEN Scanner

16.9. LIXOFLAVINA

Este considerată de unii vitamină, deoarece poate înlocui anumiți factori de creștere din hrana sobolanilor. Sub aspect structural este similară cu riboflavina, dar conține lixoza în locul ribitolului.

16.10. VITAMINA B_8

Este identică cu acidul adenozinmonofosforic (AMP). Cu toate că AMP este un compus important în biosinteza acizilor nucleici, nu poate fi considerat ca o vitamină.

16.11. VITAMINA B_7

A fost izolată din tărâțele de orez, fiind probabil identică cu biotina.

16.12. VITAMINELE B_9, B_{10}, B_{11}

Sunt probabil identice cu acizii folici și vitamina B_{12}. Au efecte antianemice la puii de găină și stimulează creșterea la numeroase microorganisme. Au fost izolate din drojdii, spanac, ficat.

16.13. VITAMINA G

Este identică cu riboflavina, iar VITAMINA J cu vitamina C_2.

16.14. VITAMINELE L_1 ȘI L_2

Sunt probabil identice cu acizii lipoici. Sunt factori de creștere pentru diferite microorganisme și de stimulare a lactației.

16.15. VITAMINELE R ȘI S

Sunt identice cu acizii folici.

16.16. VITAMINA H (FACTOR UNCULUS)

Se găsește în cantitate mai mare în zeama de varză fermentată și în sucul de banane, utilizate în medicina populară pentru tratarea ulcerului. Are efecte favorabile în ulcerul experimental produs prin histamină. Nu i s-a stabilit structura moleculară.

16.17. AMINOACIZII ȘI BAZELE AZOTATE

Sunt necesare și stimulează creșterea la organismele tinere și la numeroase microorganisme. Acești compuși însă nu pot fi considerați vitamine.

Scanned with OKEN Scanner

Capitolul 17. VITAMINA C

17.1. Scurt istoric 400
17.2. Structură moleculară şi analogi structurali 401
17.3. Proprietăţi fizice şi chimice 403
17.4. Metode de identificare şi dozare 407
17.5. Izolare, sinteză şi biosinteză 408
17.6. Răspândire în natură 412
17.7. Absorbţie, metabolism, excreţie şi necesităţi 414
17.8. Rol şi activitate biochimică 417
17.8.1. Rolul vitaminei C în formarea colagenului 417
17.8.2. Rolul vitaminei C în reacţiile de oxidoreducere 418
17.8.3. Rolul vitaminei C în sisteme enzimatice 420
17.8.4. Rolul vitaminei C în metabolismul unor aminoacizi aromatici şi în procesele de hidroxilare 420
17.8.5. Rolul vitaminei C în metabolismul acizilor folici 421
17.8.6. Rolul vitaminei C în metabolismul fierului şi în hemoglobinogeneză 421
17.8.7. Rolul vitaminei C în creşterea rezistenţei organismelor la infecţii 422
17.8.8. Rolul vitaminei C în stimularea activităţii unor hormoni 422
17.8.9. Rolul vitaminei C în metabolismul glucidelor şi al altor substanţe 422
17.9. Hipovitaminoze şi hipervitaminoze 423
17.10. Interrelaţii vitaminice 426
17.11. Antivitamine C 427
17.12. Principii terapeutice şi preparate farmaceutice 427

Vitamina C se mai numeşte acid ascorbic, acid hexuronic, vitamină antiscorbutică, factor antiscorbutic etc. Este cea mai veche sesizată şi mai bine cunoscută vitamină, în lipsa căreia din hrană apare la oameni boala numită scorbut. Vitamina C are o largă răspândire în natură fiind biosintetizată atât de organismele vegetale cât şi de cele animale (cu excepţia omului, maimuţei şi cobaiului), cât şi de numeroase microorganisme.

Vitamina C are un rol foarte important în organism întrucât are un pronunţat caracter antioxidant. Protejează de degradări oxidative numeroase substanţe biologice active, stimulează sistemul imunitar, biosinteza colagenului şi a acizilor folici, secreţia unor hormoni steroi-

dici și a unor transmițători neurotisulari, previne formarea nitrozaminelor în stomac, ia parte în metabolismul aminoacizilor, glucidelor, acizilor grași, fierului, hemoglobinei și a altor substanțe.

17.1. SCURT ISTORIC

Scorbutul este una din cele mai vechi boli cunoscută la oameni. Există date despre existența ei prezentate în „Vechiul Testament" (*Hippocrat* descrie simptomele scorbutului cu 400 de ani înainte de Cristos), în papirusul „Eber" și în scrierile lui *Plinius* referitoare la îmbolnăvirea soldaților romani și la cruciații din Egipt (cronicarul *Join Ville*, 1249). Scorbutul era semnalat și la marinarii care alcătuiau echipajele lui *Columb* și *Vascc da Gama* (1498). În Evul Mediu (1500), scorbutul devine o boală endemică în Europa de Nord, iar la sfârșitul secolului al XVII-lea a devenit o problemă gravă pentru exploratorii marinari care călătoreau mult pe mare și consumau alimente uscate și conservate.

Mulți medici și cercetători au intuit natura carențială a scorbutului și au recomandat pentru prevenirea și tratamentul acestei boli consumul de alimente proaspete: plante verzi, varză, roșii, fructe, alge, lapte, frunze de conifere etc. În 1601, *J. Lancaster* recomandă introducerea lămâilor în hrana marinarilor. *N. Venette* în 1671 și *H. Kramer* în 1720 propun introducerea obligatorie în hrana oamenilor a plantelor verzi. În 1747, medicul englez *James Lind* prescrie folosirea portocalelor și a lămâilor pentru tratarea scorbutului. În 1785, *F. Nylas* și colab. recomandă consumarea verzei crude și a altor produse vegetale neprelucrate pentru prevenirea și vindecarea scorbutului. În aceeași perioadă de timp se introduc, obligatoriu, lămâile și alte fructe proaspete în alimentația flotei britanice (G. BLANC, 1796), iar mult mai târziu se recomandă laptele proaspăt ca aliment antiscorbutic de către *J. B. Dumas* în 1871 și *N. Lunin* în 1881.

Etapa cercetărilor științifice începe cu experiențele efectuate de *A. Holst* și *T. Frôhlich*, în perioada 1907—1912 pe cobai. Acești cercetători, prin hrana utilizată au reușit să producă la cobai, simptomele specifice scorbutului la om. Ei arată că sucul proaspăt de zarzavat și fructele constituie un factor profilactic și curativ eficace iar regimul bogat în hrană uscată, în special de făinoase, favorizează apariția scorbutului, atât la marinari, cât și la cobai. Alimentele proaspete sunt bogate în „principiul antiscorbutic", care ulterior a fost asimilat cu vitaminele, de către *C. Funck*, în 1912 și denumit factor hidrosolubil C de către *Drummond* tot în 1912.

În perioada 1915—1918 se determină caracterul antiscorbutic al unor alimente administrate în hrana păsărilor și a oamenilor cu scorbut.

Factorul hidrosolubil C a fost izolat prima dată din sucul de lămâie de către *S. S. Zilva* în perioada 1923—1925. În 1927, *A. Szent-Györgyi* izolează din partea corticală a glandelor suprarenale de porc o substanță instabilă, cu puternice proprietăți oxidoreducătoare, capabilă în doze de 1 mg/zi să prevină apariția și dezvoltarea scorbutului la cobai. Același produs îl obține *A. Szent-Györgyi* în 1928 din ardei

Scanned with OKEN Scanner

și varză, stabilindu-i formula moleculară $C_6H_8O_6$, iar datorită caracterului său acid și reducător i-a atribuit denumirea de *„acid hexuronic"*.

În 1930, *A. Szent-Györgyi* demonstrează că acidul hexuronic izolat în 1927 și 1928 din glandele suparenale de porc și cel din produsele vegetale sunt compuși identici cu *vitamina C*, pe care a extras-o în cantități mari din ardeiul dulce.

În 1932, prin eforturi independente *Norman Havorth* și *Dr. Glen King* stabilesc structura chimică a vitaminei C. Tot în 1932, *A. Szent-Györgyi* și colab., independent de aceștia și *G. King* și *Waugh*, descoperă că relația dintre vitamina C și a factorului antiscorbutic este aceeași în prevenirea și tratarea scorbutului.

În 1933, Dr. *Tadeusz Reichstein* sintetizează în Basel — Elveția, acidul ascorbic, care este identic cu vitamina C naturală. Această realizare reprezintă prima treaptă în obținerea vitaminei C pe cale industrială, în 1936. Cercetări privind stabilirea structurii vitaminei C au fost efectuate anterior de *W. N. Havorth, T. Reichstein* în 1928, *P. Karrer* în 1932, *E. G. Cox* în 1932, *V. Euler* în 1933, *T. Reichstein, A. Grünsner, D. Oppenhauer* în 1933 etc., stabilind că aparțin grupului „reductonelor", care cuprinde compuși cu proprietăți oxidoreducătoare, ce reduc reactivul Tillmans.

În 1937, *W. N. Haworth* și *A. Szent-Györgyi* primeau „Premiul Nobel" pentru cercetările lor asupra vitaminei C. În 1975 mai mulți cercetători din diferite țări arată caracterul antioxidant al vitaminei C și proprietatea acesteia de a neutraliza oxigenul singlet. În 1979, Packer și colab., observă interacțiunea radicalilor liberi cu vitaminele E și C, iar *Niki*, demonstrează în 1982 regenerarea vitaminei E sub acțiunea vitaminei C. În 1985 sunt estimate necesitățile oamenilor în vitamina C pe glob, la 30 000—35 000 tone/an. În 1988, Institutul Național de Cancer din S.U.A. stabilește relația inversă care apare între cantitatea de vitamina C ingerată și apariția diferitelor forme de cancer, recomandând creșterea conținutului vitaminei C în hrană.

17.2. STRUCTURĂ MOLECULARĂ ȘI ANALOGI STRUCTURALI

Vitamina C sau acidul ascorbic are formula moleculară $C_6H_8O_6$ care sub aspect structural este γ-lactona acidului 2,3-dienol-L-gulonic (fig. 17.1), ce se formează din acidul 2-ceto-gulonic.

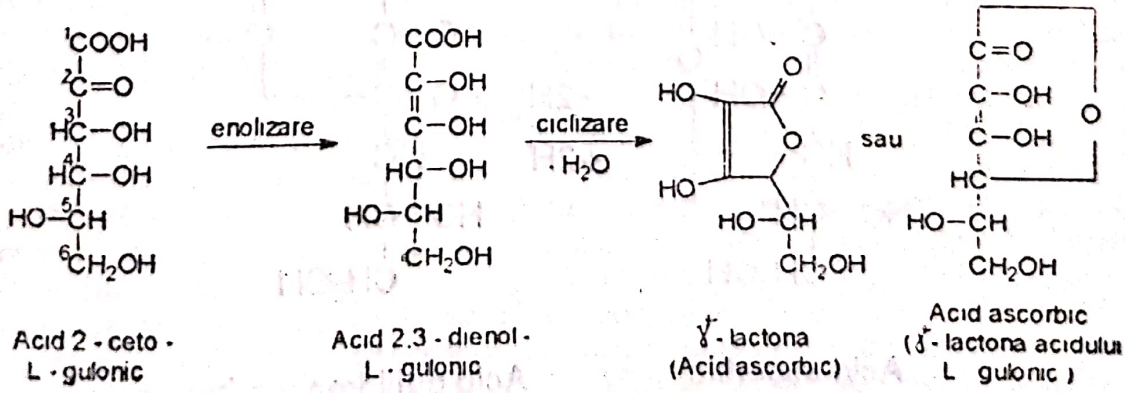


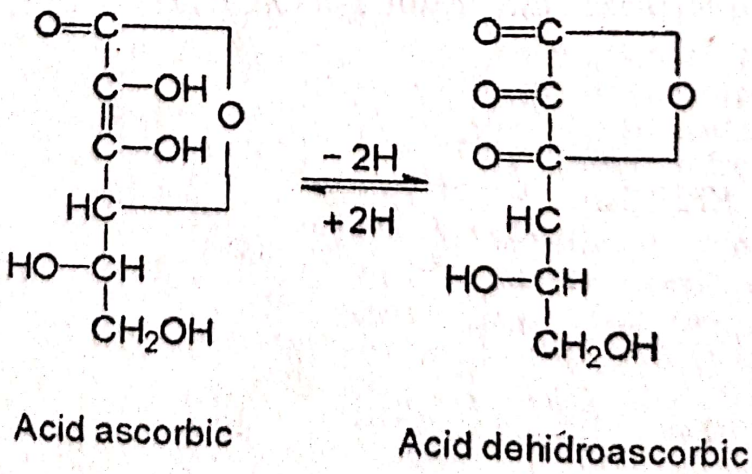
Fig. 17.1. Structura vitaminei C

Vitamina C deşi este un acid hexozic monocarboxilic nu are gruparea carboxilică liberă deoarece este blocată sub forma unei legături lactonice. Caracterul acid al vitaminei C este determinat de grupările -OH enolice, de la carbonii C-2 şi C-3, al căror atom de hidrogen poate fi uşor substituit cu metale.

Structura moleculară a vitaminei C se caracterizează prin prezenţa a două grupări -OH enolice vecine, la C-2 şi C-3, între care există o dublă legătură, prezenţa unei grupări alcoolice primare la C-6 şi a unui hidroxil secundar la C-5 în poziţie L, un ciclu furanic cu funcţie lactonică format între atomii C-1 şi C-4 şi o catenă laterală formată din 2 carboni, legată de C-4. Vitamina C reprezintă deci γ-lactona acidului L-gulonic, care conţine o grupare caracteristică „en-diol" la C-2 şi C-3. Vitamina C are atomii de carbon C-4 şi C-5 asimetrici şi se poate prezenta sub forma a doi izomeri optic activi şi doi izomeri structurali L şi D, dintre care numai izomerul L prezintă activitate vitaminică, iar izomerul D este inactiv. Prezenţa dublei legături în moleculă s-a pus în evidenţă prin reducerea catalitică a acidului ascorbic cu hidrogen. Existenţa acestei duble legături este indicată şi de carbonul enolic al grupărilor hidroxilice de la C-2 şi C-3. Acidul ascorbic structural este strâns înrudit cu hexozele, putând fi considerat lactona unui acid 2-cetohexonic. El este o γ-lactonă, ceea ce indică localizarea dublei legături între C-2 şi C-3. Vitamina C este γ-lactona acidului care se poate obţine uşor prin oxidarea gulozei.

Dintre analogii structurali ai acidului ascorbic, cu activitate vitaminică, pe primul loc se situează acidul dehidroascorbic, cu care acidul ascorbic formează cel mai important sistem de oxidoreducere din organismele vegetale şi animale (fig. 17.2).

În ce priveşte corelaţia dintre structură şi activitate s-a demonstrat că activitatea biologică şi biochimică a acidului ascorbic este determinată de prezenţa grupării funcţionale endiolice, care poate trece reversibil în grupări cetonice; configuraţia L a hidroxilului de la C-5, singurul izomer fiziologic activ; grupările enolice să fie libere, iar acidul ascorbic şi acidul dehidroascorbic să conţină ciclul lactonic între C-1 şi C-4. Formele deschise, fără ciclu lactonic, sunt complet inactive. Integritatea ciclului lactonic în molecula acidului ascorbic este absolut



Acid ascorbic Acid dehidroascorbic

Fig. 17.2. Structura acidului dehidroascorbic

Scanned with OKEN Scanner

necesară deoarece prin deschiderea acestuia se inactivează gruparea „en-diol".

Dintre analogii structurali ai acidului ascorbic, cu activitate vitaminică, pe primul loc se situează acidul dehidroascorbic, cu care acidul ascorbic formează cel mai important sistem de oxidoreducere din organismele vegetale și animale (fig. 17.2).

Acidul dehidroascorbic reprezintă forma de oxidare reversibilă a acidului ascorbic, având aceeași activitate ca și acidul L-ascorbic.

Vitamina C se găsește în natură atât în stare liberă, sub forma redusă (acid L-ascorbic), sau oxidată (acid dehidroascorbic), cât și combinată cu proteine, aminoacizi etc., care reprezintă forma de rezervă a organismului. Dintre formele complexe naturale face parte și *ascorbinogenul (J. Prochäzka,* 1953—1954), cu formula $C_7H_{19}O_7N$, care conține un radical de indol. Acest compus are o treime din activitatea vitaminică a acidului ascorbic. S-a obținut și un ascorbinogen sintetic cu formula $C_{15}H_{15}O_6N$, care are numai 1/20 din activitatea vitaminică a acidului ascorbic. În produsele naturale s-a pus în evidență și ascorbinogenul format din acid L-ascorbic și 2-hidroximetilindol, derivat din glucolrascină (glicozid vegetal), sub acțiunea mirozinazei. Se cunosc de asemenea esteri ai acidului ascorbic cu acizi grași, cum sunt mono- și dipalmitoascorbați, esteri cu acizii fosforic și sulfuric (GOTO, 1977).

Se cunosc și alți analogi structurali ai acidului ascorbic cu activitate vitaminică diferită, iar unii prezintă acțiune antivitaminică C. Principalii analogi structurali ai acidului ascorbic se prezintă în figura 17.3, iar activitatea biologică la cei care se cunoaște este trecută în procente, în comparație cu acidul ascorbic a cărui activitate se notează cu 100%.

În general acidul ascorbic și derivații săi se folosesc în industria alimentară ca substanțe antioxidante, pentru evitarea râncezirii grăsimilor, a îmbrunării, decolorării și pierderea gustului fructelor, legumelor și a compoturilor.

17.3. PROPRIETĂȚI FIZICE ȘI CHIMICE

Acidul ascorbic este o substanță solidă, se prezintă sub formă de pulbere albă cristalină, cu punct de topire la 192°C (cu descompunere) fără miros și cu gust acru. Cristalizează din soluții apoase saturate sub formă de cristale monoclinice incolore. Este o substanță optic activă dextrogiră, cu unghiul de (+)32,5° în apă și (+)48° în metanol. Are un spectru de absorbție caracteristic, cu un maxim la 245 nm în soluție slab acidă și la 265 nm în mediu alcalin, fapt ce explică prezența unui sistem de duble legături conjugate, cu o grupare OH enolizabilă. Este ușor solubilă în apă și metanol, greu solubilă în alcool etilic, acetonă și glicerină și insolubilă în eter, hidrocarburi alifatice și aromatice.

Principala proprietate a acidului ascorbic este caracterul său puternic reducător, adică ușurința cu care se poate oxida. Sub influența oxidanților slabi (brom, iod, chinonă, săruri de Cu, Ag, Fe etc.), trece reversibil în acidul dehidroascorbic, proprietate de bază pentru funcțiile sale biologice în procesele de oxidoreducere. Sub influența oxidanților puternici ($KMnO_4$, $K_2Cr_2O_7$, HNO_3, hipoiodați etc.) oxidarea acidului ascorbic continuă de la acidul dehidroascorbic în mod irever-

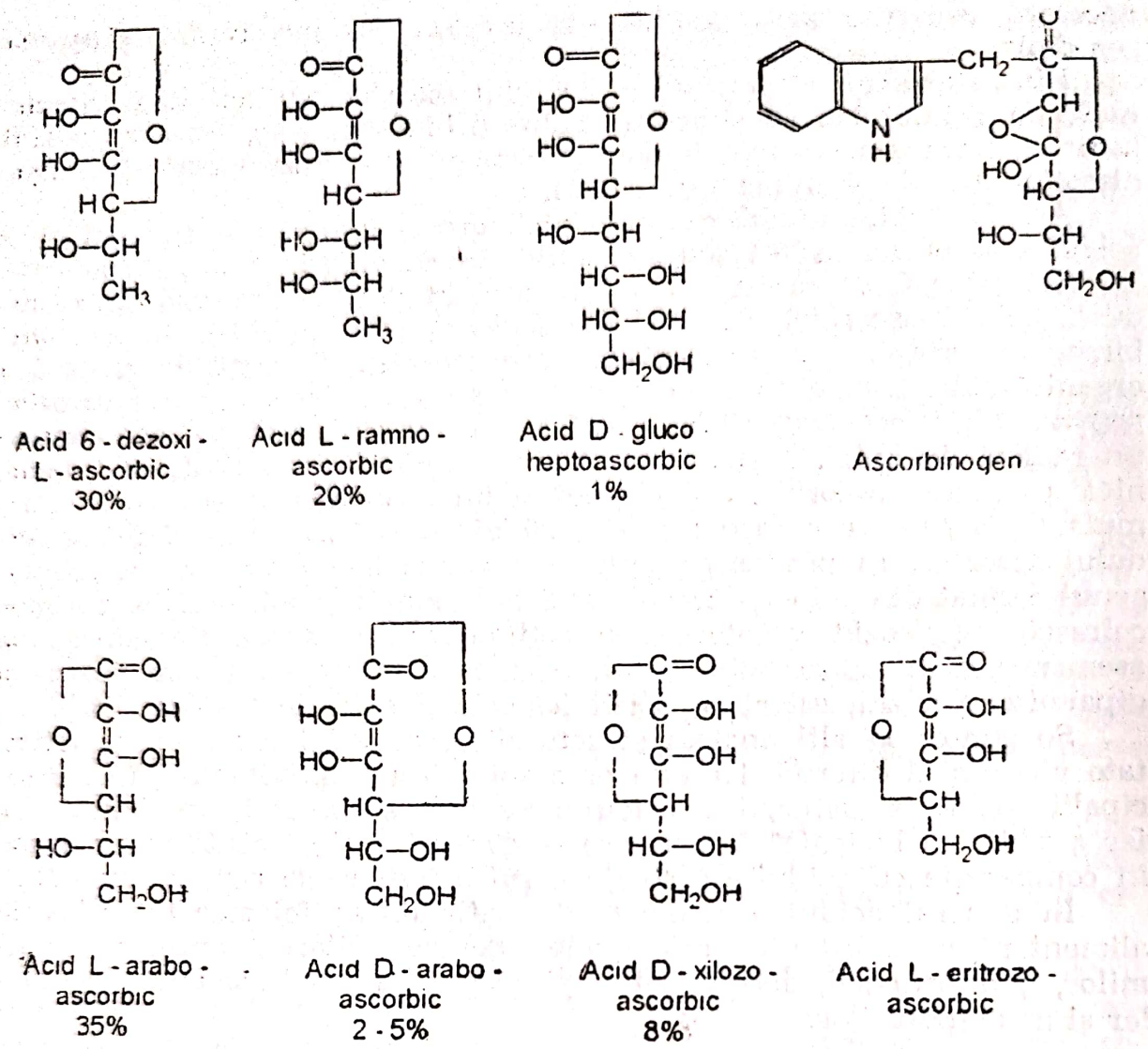


Fig. 17.3. Principalii analogi structurali ai acidului ascorbic

sibil la acizii oxalic și treonic, prin intermediul acidului dicetogulonic, care prin încălzire poate trece în CO_2 și furfurol (fig. 17.4).

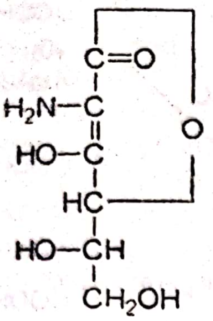
Reacțiile de degradare ale acidului ascorbic și respectiv dehidroascorbic au loc în organism în procesul metabolizării acestora și respectiv al formării produșilor de eliminare.

Puterea reducătoare mare a acidului ascorbic se datorește existenței în molecula sa a grupării endiol la C-2 și C-3.

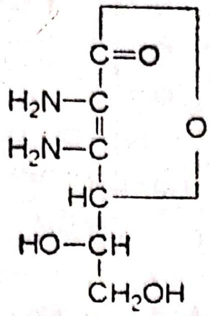
Vitamina C reduce soluțiile cuproalcaline (Fehling), $AgNO_3$, $KMnO_4$, acidul periodic. Reduce de asemenea albastrul de metilen și 2,6-diclorfenolindofenolul la leucoderivații corespunzători. Aceste substanțe pot fi folosite ca indicatori în reacțiile de oxidoreducere cu acid ascorbic. Cu clorura ferică, tetraclorura de titan și sulfatul feros, acidul ascorbic dă compuși colorați caracteristici. Reacționează cu dinitrofenilhidrazina și formează osazone de culoare roșie, reacția fiind foarte sensibilă și la diluții mari de 5 $\mu g\%$ acid ascorbic.

Acidul ascorbic reacționează cu ionii unor metale (Na^+, Ca^{2+}, Fe^{3+}, NH_4^+)cu formare de săruri (ascorbați) solubile în apă. Ascorbatul de plumb este insolubil în apă și etanol, proprietate pe care se bazează metodele de izolare a acidului ascorbic din extractele vegetale. În so-

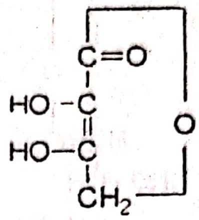
Scanned with OKEN Scanner



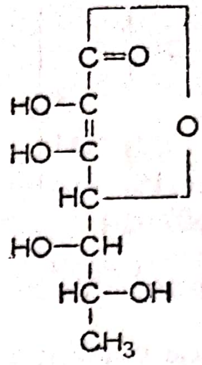
Acid 2 - dezoxi - - 2 - aminoascorbic



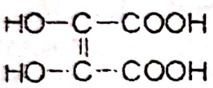
Acid 2,3 - dezoxi - 2,3 - diaminoascorbic



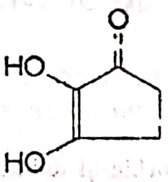
Acid hidroxi - treonic



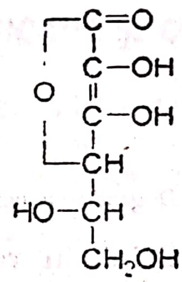
Acid L - fructo - ascorbic 2 - 3%



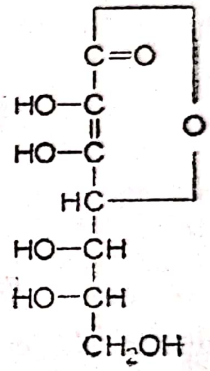
Acid dihidroximaleic



Acid reductonic



Acid D - galacto - ascorbic sub 1%



Acid L - gluco - ascorbic 25%

Fig. 17.3. (continuare) Principalii analogi structurali ai acidului ascorbic

luţii la aer şi lumină, acidul ascorbic se oxidează uşor, mai ales în prezenţa ionilor de cupru şi argint, iar prin încălzire în mediu de HCI, trece în furfurol. Oxidarea se intensifică prin încălzire în mediu alcalin. În absenţa aerului, soluţiile de acid ascorbic sunt stabile şi după încălzire la 100°C. În soluţii acide şi în absenţa aerului, oxidarea acidului ascorbic este mult mai rezistentă la temperaturi mai ridicate, de aceea obţinerea sa industrială se face în aceste condiţii de păstrare a soluţiilor, în mediu acid şi în lipsa oxigenului.

Acidul ascorbic, prin hidrogenare în curent de hidrogen la 60 atm şi 35—40°C, în prezenţa platinei se transformă în acid idonic

$$(\mathrm{HOOC-\underset{OH}{CH}-\underset{OH}{CH}-\underset{OH}{CH}-\underset{OH}{CH}-CH_2OH})$$

Prin oxidare lentă acidul ascorbic se transformă în acid dehidroascorbic, care poate fi uşor redus, refăcând acidul ascorbic. Acest proces reversibil de oxidoreducere, are un rol important în metabolismul nuclear, realizând transportul neenzimatic al hidrogenului. Gruparea

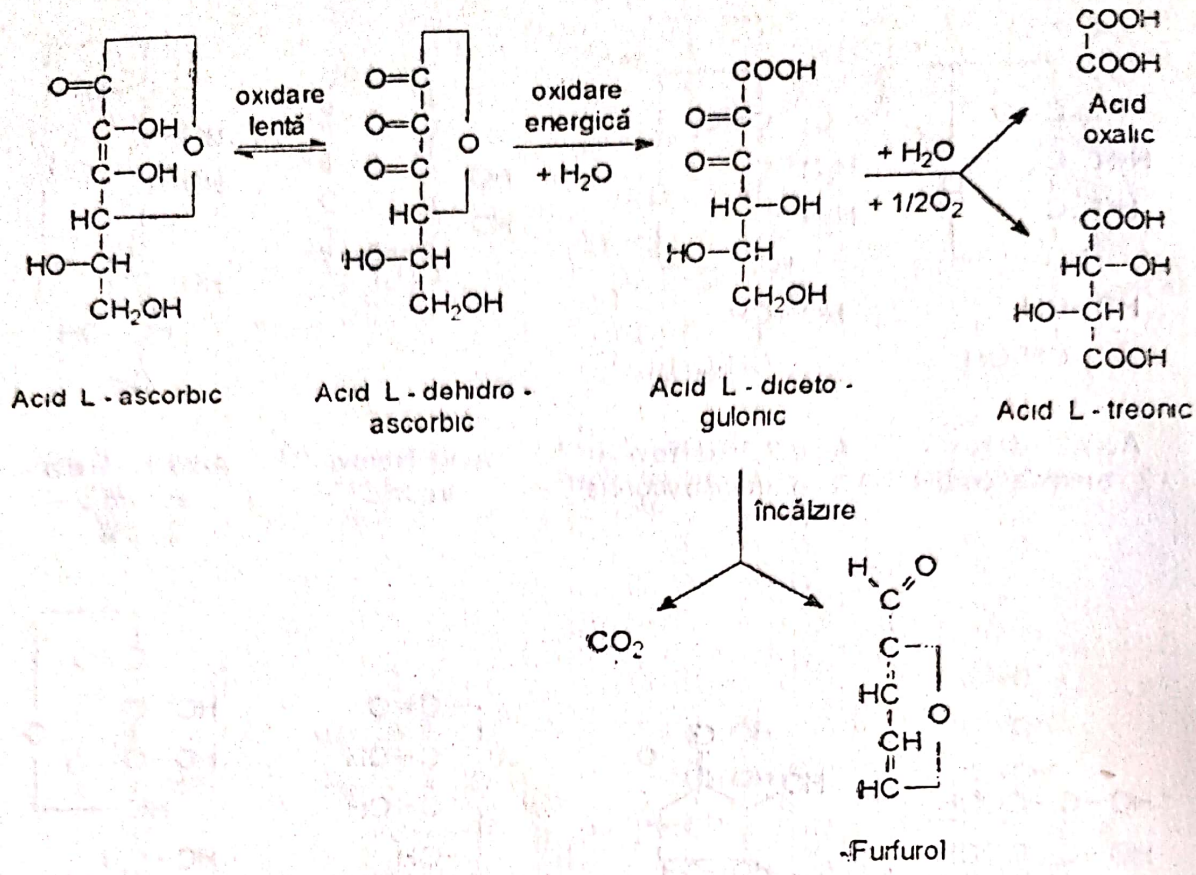


Fig. 17.4. Degradarea acidului ascorbic şi dehidroascorbic

funcţională care participă în reacţiile de oxidoreducere este gruparea dienolică, care prin oxidare trece în gruparea dicetonică şi invers, prin reducerea grupărilor cetonice de la C-2 şi C-3 se obţin doi hidroxili enolici. Reacţia de oxidare a acidului ascorbic este inhibată de glutation, cisteină şi de cianuri.

Acidul L-dicetogulonic nu are proprietăţi vitaminice. El reacţionează „in vitro" cu o nouă moleculă de acid ascorbic şi se transformă prin încălzire în furfurol şi CO_2. În organism, acidul L-dicetogulonic se poate transforma în acid L-treonic şi acid oxalic, care se elimină prin urină. Ruperea legăturii lactonice privează acidul dehidroascorbic de proprietăţile sale vitaminice.

Acidul ascorbic prezintă unele reacţii caracteristice glucidelor. Reduce sărurile de cupru şi argint şi dă reacţie pozitivă cu α-naftolul (reacţia Mölisch). Are caracterul unui acid monobazic, având în soluţie apoasă un pH = 3. Caracterul acid nu este determinat de gruparea carboxilică, care este blocată sub forma unei legături γ-lactonice, ci de hidroxidul lui enolic de la C-3, care are o mare putere de ionizare acidă (pK_1 = 4,1). Hidroxilul enolic de la C-2 are o capacitate de ionizare mai mică (pK_1 = 11,6). Caracterul acid al hidroxililor enolici din molecula acidului ascorbic se evidenţiază şi prin faptul că acest caracter dispare prin oxidarea lor în grupări cetonice, iar sub acţiunea halogenilor, aceştia nu sunt adiţionaţi, ci au o acţiune de oxidare, transformând grupările dienolice în grupări dicetonice.

Oxidarea acidului ascorbic în acid dehidroascorbic se realizează în organism sub acţiunea unor enzime specifice (ascorbicoxidaza, sau in-

Scanned with OKEN Scanner

direct sub acțiunea peroxidazelor, polifenoloxidazelor, citocromoxidazei, a unor chinone, săruri de Cu, Fe, flavine etc. Potențialul de oxidoreducere a acidului ascorbic variază în soluție cu pH-ul și cu temperatura; $E_0 = +0{,}166$ V la pH = 4 și t = 35°C.

Acidul ascorbic în stare cristalină este relativ stabil. În soluție apoasă, prin expunere la aer și lumină, la temperatura camerei, pierde 35% din activitate, după o zi și respectiv 75% după două zile. Pierderile cresc prin ridicarea temperaturii și a pH-ului. Acidul ascorbic este sensibil la acțiunea radiațiilor UV și a celor catodice, care contribuie la distrugerea proprietăților sale vitaminice.

Acidul ascorbic se găsește în organism sub forma unor complecși stabili cu proteine, peptide, aminoacizi, care complexează metalele catalitice distrugătoare (Pb^{2+}, Zn^{2+}, Co^{2+}, Fe^{2+}, Mn^{2+}, Ni^{2+}, Ca^{2+}, Mg^{2+}, Al^{3+}, Cr^{2+}, Cu^{2+}). Efectul stabilizator al cisteinei se datorește grupărilor sale —SH, care la fel ca și în alți compuși cu —SH (Glutation—SH) contribuie la transformarea acidului dehidroascorbic în acid ascorbic. Carotenoidele, vitaminele A și E, protejează vitamina C prin efecte antioxigen.

17.4. METODE DE IDENTIFICARE ȘI DOZARE

Metode fizice. Cele mai utilizate metode fizice sunt cele spectrofotometrice, polarometrice, cromatografice și radiometrice. În soluții slab acide, vitamina C are un maxim de absorbție la 254 nm, iar în soluții alcaline la 265 nm, care sunt o dovadă a sistemului endiol. Metoda polarografică se utilizează la dozarea vitaminei C din sucuri vegetale. Ea se bazează pe determinarea potențialului de oxidare în mediu acid.

Metode chimice. Aceste metode se bazează în principal pe caracterul reducător al acidului ascorbic.

Vitamina C în soluție apoasă tratată cu HNO_3 10% și $AgNO_3$, dă un precipitat cenușiu. Cu nitroprusiatul de sodiu dă o colorație galben-verzuie, care după adăugare de acid acetic 30%, trece în albastru, verde și apoi în brun. Dozarea vitaminei C se face prin titrarea extractelor acesteia în mediu acid, cu iodat de potasiu, în prezență de amidon.

Identificarea și dozarea vitaminei C se poate realiza și cu 2,6-diclorindofenol (reactiv Tillmans, 1930) pe baza unei reacții de oxidoreducere, cu schimbarea culorii indicatorului de la albastru în mediu bazic și roșu în mediu acid la forma incoloră. Această metodă este mult utilizată datorită ușurinței cu care se poate realiza și sensibilității reactivului. Acidul ascorbic în urma oxidării trece în acid dehidroascorbic.

Metoda cu utilizarea dinitrofenilhidrazinei (metoda Roe-Kuether; DNFH) se folosește frecvent pentru dozarea acidului ascorbic și dehidroascorbic din lichide biologice (sânge, lapte, urină etc.). Prin tratarea acidului ascorbic și dehidroascorbic cu dinitrofenilhidrazina se formează osazone colorate, care pot fi determinate la 520—540 nm.

Metoda Martini-Bousingore se bazează pe trecerea albastrului de metilen la leucoderivat. Această metodă este utilizată pentru determinarea vitaminei C din produse naturale și farmaceutice.

Scanned with OKEN Scanner

Alte metode folosesc reducerea Fe^{3+} la Fe^{2+} de către acidul ascorbic și dozarea sărurilor feroase cu α, α-dipiridil, reacțiile cu săruri de uranil, cu sulfamide diazotate, cu nitroaniline etc.

Vitamina C dă diferite reacții de culoare; violetă cu Fe^{3+}, albastră-violetă cu Fe^{2+}, roșie cu $TiCl_4$, violetă cu fosfomolibdotungstat. O parte din aceste reacții nu sunt specifice pentru vitamine C, întrucât se pot obține și cu alte substanțe reducătoare din produsele naturale (cu grupări -SH), fapt pentru care este necesar ca vitamina C să fie cât mai pură. Se vor face extracții cu solvenți organici, precipitări selective, purificări prin metode cromatografice.

Vitamina C se poate obține în stare pură prin cromatografierea extractelor din diferite surse naturale, pe hârtie de filtru impregnată cu acid oxalic 2% și eluare dublă, prima cu n-butanol și acid oxalic, iar a doua eluare cu fenol, urmată de dozarea eluatului cu reactiv Tillmans.

Se pot utiliza și metode enzimatice care folosesc ascorbicoxidaze enzime specifice numai pentru acidul ascorbic. Aceste metode se efectuează cu probe martor. În principiu, se dozează puterea oxidoreducătoare totală dintr-un extract, printr-o metodă fizico-chimică oarecare. Se ia apoi aceeași cantitate de extract în care se adaugă o anumită cantitate de ascorbioxidază și după un anumit timp se face o nouă dozare. Cantitatea de vitamină se calculează prin diferența dintre cele două determinări.

Metodele biologice folosesc cobaiul pentru experiențe. În metodele preventive se determină cantitatea minimă de acid ascorbic necesară pentru a preveni scorbutul, iar în metodele curative se determină cantitatea minimă de vitamină C capabilă să vindece scorbutul. Cobaiul este singurul animal de laborator sensibil la carența în acid ascorbic.

Metodele biochimice și cele chimice se bazează pe determinarea activității fosfatazei alcaline, care scade în scorbut și crește în rahitism. Acest indicator poate fi utilizat pentru a stabili carența în vitamina C și eficiența acesteia în tratamentele curative. Se pot utiliza și metode pentru dozarea vitaminei C din urină (ascorbinuria). Valorile zero și cele mici indică o stare de carență în vitamina C. În mod similar se poate determina vitamina C din sânge (ascorbinemia). În clinică se mai folosește și proba „ascorbinemiei provocate", prin administrarea „per os" a 100 mg/kg greutate corp și determinarea acidului ascorbic din urină după 4 ore de la administrare și în continuare.

Dozarea vitaminei C din leucocite și plachete se folosește în stabilirea diagnosticului stării de carență. În stare de carență ascorbică, conținutul vitaminei C din aceste formațiuni scade de la valorile normale de 25—40 mg vitamină C/100 g la zero.

Unitatea Internațională de vitamina C este egală cu 0,05 mg de acid ascorbic pur, iar 1 mg de acid ascorbic este egal cu 20 UI.

17.5. IZOLARE, SINTEZĂ ȘI BIOSINTEZĂ

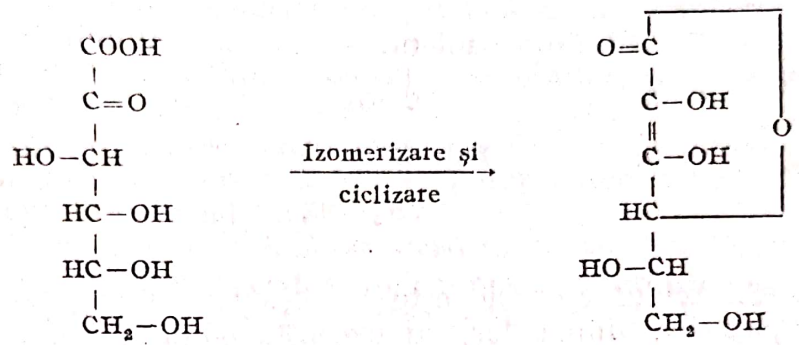
Acidul ascorbic se poate obține prin extragerea din diferite surse vegetale cum sunt fructele citrice, ardeiul verde, cojile verzi ale nucilor, coacăze negre, frunze de trandafiri etc. În sursele vegetale aci-

Scanned with OKEN Scanner

dul ascorbic se găsește atât în stare liberă cât și sub formă de ascorbinogen. În timpul extracțiilor cu apă în mediu acid vor trebui luate măsuri de protecție față de acțiunea oxidanților, care ar putea distruge acidul ascorbic. Se vor evita prezența oxigenului, a urmelor de metale, a compușilor cu -SH și a altor reducători.

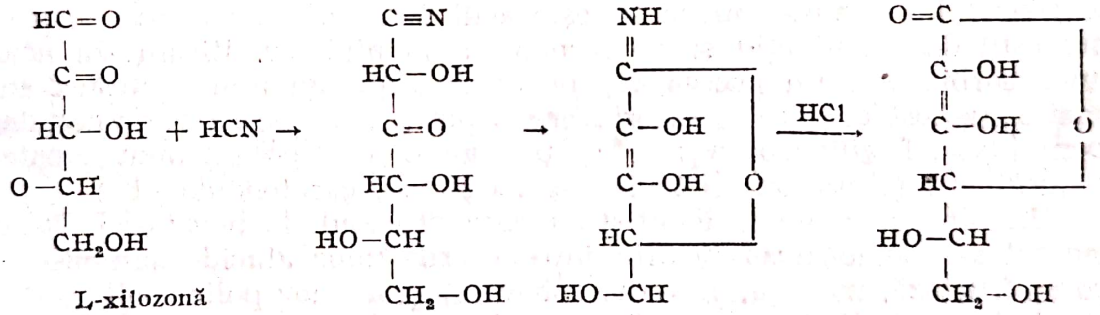
În prezent acidul ascorbic se obține prin sinteză pe cale industrială, folosind mai multe procedee și materii prime.

a. Sinteza acidului ascorbic din acizi 2-cetohexonici prin izomerizare și lactonizare



Ac$_2$d 2-cetogluconic — Acid ascorbic

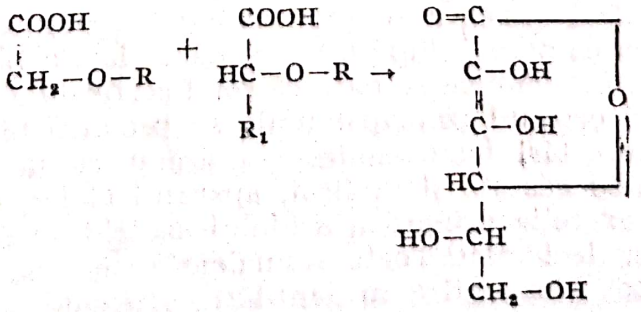
b. Sinteza acidului ascorbic din L-xilozonă prin adiție de acid cianhidric. În acest procedeu apar ca produși intermediari un ceto-hidroxinitril și acidul L-iminoascorbic.



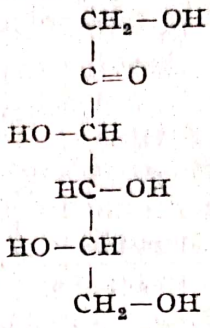
L-xilozonă — Compus nitrilic — Acid imino-L-ascorbic — Acid ascorbic

L-xilozona se poate obține din diferite hexoze, inclusiv din glucoză și galactoză.

c. Un alt procedeu mai vechi a constat în sinteza acidului ascorbic prin condensarea esterilor unor α-hidroxiacizi.



Sinteza acidului ascorbic din L-sorboză este cel mai eficient și mai utilizat procedeu. L-sorboza se obține pe cale industrială din glucoză, care prin hidrogenare catalitică formează d-sorbitolul. Acesta este apoi oxidat pe cale biologică la L-sorboză, care tot prin oxidare se transformă în acid 2-cetosorbonic. Procesele următoare constau în izomerizarea și lactonizarea acidului 2-cetosorbonic (sau a altor acizi 2-cetohexonici), luându-se măsuri de protejare a grupărilor hidroxilice.



L-sorboză

Biosinteză. Acidul ascorbic este biosintetizat de organismele vegetale, de majoritatea animalelor, cu excepția omului, cobaiului și maimuțelor, a unor păsări și pești exotici și parțial a căprioarei, precum și de unele microorganisme. Pentru lactobacili și alte microorganisme acidul ascorbic este un factor necesar de creștere.

În plante, acidul ascorbic este biosintetizat în cantitate mare în cloroplaste și în zonele de creștere mai intensivă, în țesuturile meristematice. În semințe nu se găsește acid ascorbic, dar acesta apare în procesul de germinație și de formare a plantulelor. Biosinteza acidului ascorbic este un proces dependent de prezența unui complex enzimatic (ascorbicoxidaza, ascorbicoreductaza, catalază, citocromoxidaza, peroxidaza, L-gulonooxidaza etc.), precum și de prezența unor substanțe reducătoare (glutation, cisteină, homocisteină, carotenoide etc.).

Lumina și monoglucidele stimulează procesul de biogeneză. Experimental s-a demonstrat că prin introducerea unor glucide solubile (glucoză, fructoză, manoză, sorboză, zaharoză) și a unor polialcooli (sorbitol, manitol, inozitoli) în țesuturile vegetale, prin vacuuminfiltrație, se constată o creștere semnificativă a biosintezei acidului ascorbic, fapt ce reflectă originea glucidică a acestei vitamine.

În procesul de biosinteză a acidului ascorbic din hexoze, formele D vor suferi un proces de izomerizare, transformându-se în steroizomeri L, iar aceștia prin oxidare vor forma acizi 2-cetohexonici, care prin ciclizare se transformă în γ-lactone. Dintre acestea, γ-gulonolactona și glucuronolactona sunt precursori universali ai acidului ascorbic. Diglucidele și poliglucidele pot contribui la biosinteza acidului ascorbic numai în urma hidrolizării acestora în monoglucide. Pentozele vor putea lua parte în acest proces numai după transformarea lor în hexoze, prin ciclul pentozofosfaților. La animale se pare că zona corticală a glandelor suprarenale reprezintă organul principal unde se produce biosinteza acidului ascorbic. Prin cercetări histochimice s-a arătat că un conținut ridicat de acid ascorbic se găsește și în ficat, aparatul Golgi, mitocondrii, ochi etc. La șobolan excreția urinară a acidului ascorbic a fost mult scăzută în urma suprarenalectomiei. Toate animalele au nevoie de acidul ascorbic pe care îl pot biosintetiza în cantități suficiente, cu excepția celor

Scanned with OKEN Scanner

menționate și a unor mamifere (căprioara) exotice și parțial a unor animale provenite din regiunile tropicale datorită lipsei enzimelor care determină formarea și transformarea acizilor 2-cetohexonici în lactonele corespunzătoare (L-gulonolactonaza, L-galactonolactonaza, glucuronil-transferaza, glucuronodehidrogenaza, L-gulonooxidaza). Organele principale pentru biosinteza acidului ascorbic sunt glandele suprarenale și ficatul pentru mamifere, rinichi pentru păsări, amfibii și reptile. Organismele care nu pot biosintetiza acidul ascorbic sunt dependente integral de aportul său alimentar.

Biosinteza acidului ascorbic atât în plante cât și în animale se realizează din glucide. Cu ajutorul izotopilor radioactivi ^{14}C s-a demonstrat la șobolan biosinteza acidului ascorbic din glucoză și galactoză conform schemelor din figura 17.5.

Seria acestor procese enzimatice necesită o inversiune a acestor molecule, din formele sterice D în configurația sterică L, formă sub care acidul ascorbic este biologic activ.

Acidul D-ascorbic este biologic inactiv. Aceste transformări necesită prezența unor enzime specifice (glucuronatdehidrogenaze, glucuronil-transferaze), precum și sistemul citrocromic, NAD și NADP, prezența ionilor de Mn^{2+}, Mo^{2+}, Mg^{2+}, K^+ etc. Ionii de mangan sunt absolut necesari acestui proces de biosinteză. Țesuturile vegetale și animale care biosintetizează acidul ascorbic au un conținut ridicat de Mn^{2+}. Prin adăugarea unor cantități sporite de Mn^{2+} „in vitro" pe secțiuni hepatice

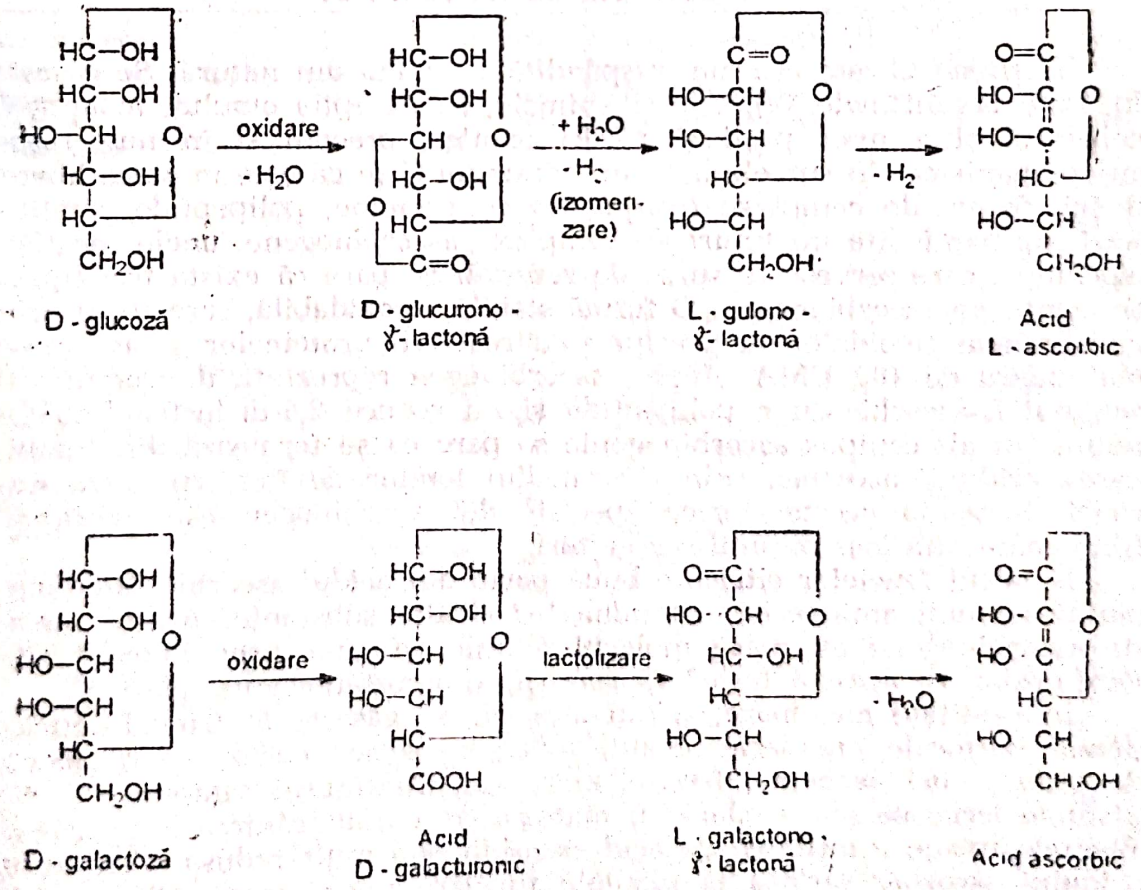


Fig. 17.5. Biosinteza acidului ascorbic din glucoză și galactoză

de cobai, acestea devin capabile să producă acid ascorbic. Se pare că incapacitatea omului, maimuței și cobaiului de a biosintetiza acid ascorbic s-ar datora pe lângă lipsa unui sistem enzimatic de transformare a monoglucidelor în acid ascorbic, în fazele finale ale acestui proces și conținutului extrem de redus a țesuturilor în Mn^{2+}.

Biosinteza acidului ascorbic este intens stimulată de unii compuși endogeni (aminoacizi, metaboliți ai hormonilor, bilirubină, de unele vitamine) cât și exogeni de unele medicamente (anestezice, hipnotice, antireumatice, analgezice etc.), de agenți poluanți, substanțe cancerigene, insecticide, fumat etc. Aceste substanțe, dintre care majoritatea sunt nocive, determină o inducție enzimatică, care va forma mecanisme de apărare a organismelor față de metaboliții toxici, cu declanșarea unor procese biochimice de detoxifiere și de intensificare a biosintezei acidului ascorbic.

La plante, tot prin metoda izotopilor radiactivi, s-a pus în evidență transformarea L-gulonolactonei; L-galactolactonei; D-glucurolactonei, metil-D-galacturonei în acid ascorbic, confirmându-se mecanismele prezentate în figura 17.5.

Unele microorganisme ca *Acetobacter suboxydans, Pseudomonas fluorescens* etc., biosintetizează acidul ascorbic și acidul 2-cetogulonic din glucoză în cantități mari încât aceste microorganisme sunt folosite pentru obținerea pe cale industrială a acidului ascorbic.

17.6. RĂSPÂNDIRE ÎN NATURĂ

Vitamina C este cea mai răspândită vitamină din natură. Se găsește în toate organismele vegetale și animale, cu excepția omului, maimuței, cobaiului și a unor pești și păsări exotice, precum și în numeroase microorganisme. În sursele naturale vitamina C se găsește în stare liberă și sub formă de complexe (conjugate) cu proteine, polipeptide, aminoacizi, formând diferite tipuri de complexe ascorbinogene, unele inactive biochimic, care servesc ca surse de rezervă. Se pare că există trei tipuri de complexe ascorbinogene. O formă stabilă, neoxidabilă, care trece prin membranele coloidale, nu precipită cu reactivii proteinelor și are masa moleculară de 400 UMA. Acest ascorbinogen reprezintă un compus al acidului L-ascorbic cu o polipeptidă și nu reduce 2,6-diclorfenolindofenolul. Un alt compus ascorbinogenic se pare că se formează din combinarea acidului ascorbic, prin intermediul ionilor de fier, cu acizii nucleici. Prezența acestei forme speciale de ascorbinogen este nesigură, fiind contestată însă de unii cercetători.

În sucul fructelor citrice o bună parte din acidul ascorbic este combinată cu unii aminoacizi, vitamina PP și alte substanțe. Aceste forme de ascorbinogene au mase moleculare mici și sunt ușor hidrolizabile. Este posibil ca această formă să reprezinte ascorbinogenul „clasic".

În cantitate mai mare, acidul ascorbic se găsește în fructele citrice (lămâi, portocale, mandarine, rodii), măcește, coarne, coacăze negre, fructe de cătină, nuci necoapte, frunze, mere etc. Conținutul vitaminei C din plantele ierboase scade odată cu maturarea și îmbătrânirea acestora. În plantele uscate, cantitatea de acid ascorbic este mult redusă. Conținutul acidului ascorbic variază la plantele furajere tinere între 4,25 — 5,66 mg/g, iar la cele mature între 0,7 — 1,1 mg/g. Cerealele au un conținut

Scanned with OKEN Scanner

de acid ascorbic mult redus. În organismele animale, cantitatea de acid ascorbic variază în funcție de organ și țesut. Un conținut ridicat în acid ascorbic îl au glandele suprarenale, hipofiza, ficatul, rinichii etc. În suprarenalele de bou, acidul ascorbic se găsește în cantitate de 150 — 270 mg%, iar la porc de 90 — 200 mg%. La om conținutul acidului ascorbic variază în funcție de vârstă, având valori de 30 mg% până la vârsta de un an, 20 mg% între 1 — 10 ani, iar la bătrânețe până la 5 mg%. În hipofiza umană se găsesc 100 — 150 mg% vitamină C, iar în corticosuprarenale 200 mg%, în corpul galben 15 — 20 mg/100 g, iar în lichidul cefalorahidian 2 mg/100 ml. O cantitate mai însemnată de acid ascorbic se găsește și în zona peridentară, în cristalin și cornee. Acidul ascorbic inhibă evoluția cataractei. Conținutul mediu al acidului ascorbic depozitat în corp este de 20 mg/kg greutate corp iar în glanda pituitară de 400 mg/kg.

Conținutul în acid ascorbic din diferite organe și țesuturi este cu atât mai mare cu cât activitatea metabolică a acestora este mai intensă. Țesuturile tumorale au un conținut ridicat de acid ascorbic. Conținutul acidului ascorbic din unele produse vegetale și animale se prezintă în tabelul 17.1.

Tabelul 17.1

Conținutul în acid ascorbic în unele produse vegetale și animale, în mg/100 g

Produs	Conținut mg/100 g	Produs	Conținut mg/100 g
Ace conifere	100—300	Morcov proaspăt	5— 10
Afine	5	Mure	5— 8
Agrișe	30— 50	Miere de albine	100
Ananas	40	Nuci verzi (coji)	1 000—18000
Ardei roșu	250—300	Ou de găină	0,5— 1
Ardei verde	100—200	Orez boabe	2,4—3,4
Castraveți	5	Pătârnac	40
Caise	7— 20	Pătrunjel	150
Cartofi	15— 22	Pere	4— 10
Căpșuni	25—120	Pepeni verzi	7,0
Ceapă	60	Bepeni galbeni	20
Coarne	50— 60	Piersici	10— 19
Coacăze albe (fructe)	5— 6	Portocale	40— 80
Coacăze roșii	30— 70	Prune	7— 14
Coacăze negre	140—300	Ridichi	20
Colostru	7	Roșie proaspătă	18— 45
Conopidă	70	Salată	10— 50
Dovlecei	26— 30	Sfeclă	5— 10
Fasole verde	7— 14	Sfeclă de zahăr	30— 40
Fragi	28— 45	Spanac	225
Grapefruit	40	Suc de portocale	20— 50
Gutui	10— 38	Suc de lămâi	40— 75
Hrean proaspăt	200	Suc de mandarine	10— 78
Lapte uman	4— 7	Suc de tomate	10— 12
Lapte de vacă proaspăt	0,5—2,5	Țelină	10
Lămâi (zeamă)	30— 78	Tomate pastă	30— 50
Lobodă	140—150	Urzici	100
Lucernă	225	Varză albă murată	17— 25
Măceșe	120—800	Varză roșie	50
Mazăre verde	25— 35	Vinete	60
Mandarine	30— 45	Zmeură	28— 45
Mărar	50—150		

Scanned with OKEN Scanner

Acidul ascorbic este prezent în toate celulele vii din regnul vegetal și animal în cantități foarte diferite. Omul și numeroase animale au nevoie de un aport alimentar de acid ascorbic. Plantele verzi, legumele și fructele proaspete reprezintă importante surse naturale bogate în acid ascorbic. Există variații în conținutul acidului ascorbic din produse vegetale și animale în funcție de felul lor și perioada de păstrare, de pregătirea culinară a acestora. Acidul ascorbic în stare liberă este sensibil la fierbere, dar cel aflat sub formă de ascorbinogen este rezistent, fapt ce determină ca prin fierbere să nu se degradeze cantități mari de vitamină C totală. Prezența urmelor de Fe și Cu, mărește degradarea acidului ascorbic prin fierbere. Fierberea cu Na_2CO_3 mărește degradarea vitaminei C, iar NaCl micșorează procesul de degradare.

Produsele vegetale pierd prin păstrare o cantitate însemnată de acid ascorbic. În cazul păstrării acestora la temperaturi scăzute, degradarea vitaminei C este minimă. Cartofii prin păstrare la temperatura camerei pierd aproximativ 15% din conținutul vitaminei C la fiecare lună, iar prin fierbere decojiți pierd 30—50%.

17.7. ABSORBȚIE, METABOLISM, EXCREȚIE ȘI NECESITĂȚI

Absorbție. Vitamina C provenită din alimente este absorbită în tubul digestiv similar monoglucidelor. În cantitate mică se absoarbe la nivelul cavității bucale și în stomac, iar cea mai mare parte se absoarbe rapid la nivelul intestinului subțire, în duoden și mai lent în jejun. Absorbția vitaminei C din alimente prin aparatul digestiv se face prin mecanisme pasive (difuzie) și active (fosforilare). Complexele proteice ale vitaminei C (ascorbinogen) și alte complexe ascorbice (cu vitamina PP, aminoacizi etc.) vor suferi în prealabil o hidroliză sub acțiunea sistemelor enzimatice digestive și a ascorbicohidrolazei. Absorbția este diminuată în cazul existenței unor afecțiuni digestive, lezarea mucoaselor intestinale, aclorhidrie, prezența de antivitamine. Absorbția vitaminei C se realizează atât în forma redusă (acid ascorbic), cât și cea oxidată (acid dehidroascorbic). Se pare că acidul dehidroascorbic ajuns în celulele intestinale se reduce la acid ascorbic. După absorbție, acidul ascorbic este transportat pe cale sanguină la toate organele și țesuturile, unde concentrația sa este proporțională cu activitatea metabolică a acestora.

Acidul ascorbic are capacitatea de a trece bariera placentară astfel că la făt ajunge prin circulația maternă. În sângele cordonului ombilical, concentrația acidului ascorbic este mai mare decât în sângele matern, fapt ce denotă că placenta biosintetizează sau concentrează acidul ascorbic.

Accelerarea tranzitului intestinal este un factor care micșorează resorbția acidului ascorbic. În perioada diareelor sau a utilizării laxativelor, crește simțitor eliminarea acidului ascorbic prin fecale, prin care în condiții normale se elimină aproximativ 5 mg/zi.

Absorbția acidului ascorbic este rapidă în comparație cu absorbția altor vitamine. Concentrația maximă se realizează în leucocite la 4 ore de la administrarea orală a unei doze de 500 mg acid ascorbic. În urină acidul ascorbic apare după 3 ore de la administrare. Rezervele organismului uman sunt mici în acid ascorbic, în jur de 1 500 mg, din care

aproximativ 5—15 mg/100 g țesut, se găsesc în ficat, fapt pentru care este necesar aportul alimentar al acestei vitamine. Plasma sanguină conține aproximativ 0,8—1,8 mg de acid ascorbic. Un conținut de acid ascorbic sub 0,8 mg/100 ml plasmă, indică o stare de carență, cu manifestări clinice hipovitaminozice. Un conținut cuprins între 0,8—1,2 mg/100 ml indică o stare „limită", iar cel cuprins între 1,2—1,6 mg/100 ml reflectă o stare normală, apropiată de gradul de saturare. Leucocitele contin cantități de 100—200 ori mai mari decât plasma și pot fi considerate ca „forme de depozit circulante". (BEDELEANU, 1985).

Durata de viață a acidului ascorbic la om este de 16 zile, la cobai, mai puțin de 3 zile, iar la șobolan dispare rapid. Se pare că animalele care nu pot să producă acidul ascorbic îl mențin mai mult în organism, îl „economisesc", în timp ce speciile care îl pot biosintetiza nu îl reține mult în organism, deoarece îl pot produce după necesități.

Metabolism. După absorbție, acidul ascorbic se transformă reversibil în acid dehidroascorbic, care reprezintă prima etapă a metabolizării sale. Raportul acid ascorbic/acid dehidroascorbic din plasmă se corelează cu cantitatea totală de acid ascorbic din organism. La concentrații mai mari, peste 1 mg/100 ml plasmă, cel puțin 90% din total se găsește sub formă redusă, deci de acid ascorbic, iar restul sub formă de acid dehidroascorbic. La concentrații mici de acid ascorbic total, sub 0,3 mg/100 ml plasmă, numai 40% se găsește sub formă redusă. Cantitatea de acid ascorbic din eritrocite este puțin mai mare decât cea din plasmă. Stabilitatea acidului ascorbic este mai mare în leucocite și trombocite (plăcuțe), iar conținutul acidului ascorbic scade mai lent din aceste globule. Valorile mici sau zero ale acidului ascorbic din leucocite și trombocite este un indiciu cert al carenței în această vitamină. În continuarea procesului de metabolizare a acidului ascorbic în organism, acidul dehidroascorbic format în prima etapă se va degrada ireversibil în acidul 2,3-diceto-L-gulonic, care se va degrada ulterior în diferiți compuși în funcție de enzimele diferitelor specii care acționează asupra lui. În rinichiul de șoarece acest acid se degradează prin decarboxilare la acid L-lixonic și D-lixonic, cu degajare de CO_2, iar în ficatul de cal se transformă în L-xiluloză și CO_2. La om, cobai, porc, șobolan etc., acidul 2,3-diceto-L-gulonic se degradează în acid treonic și acid oxalic.

Excreția acidului ascorbic se face prin urină, transpirație, plămâni și fecale (5 mg/zi). Acidul ascorbic introdus prin alimente este metabolizat în organism în proporție de 50—70% în diferiți compuși inactivi, restul se elimină ca atare prin urină. La cobai și șobolani, metaboliții esențiali sunt CO_2, care se elimină prin plămâni și acidul oxalic, iar la om acizii treonic, oxalic și dicetogulonic, care se elimină prin urină.

Cantitatea de acid ascorbic și de metaboliți ai acestuia depinde de cantitatea ingerată, de gradul de saturație a organismului, de starea de sănătate și de vârstă. Omul adult elimină prin urină zilnic aproximativ 25—40 mg de acid ascorbic din cantitatea ingerată și cea produsă de flora intestinală. Dacă cantitatea eliminată este de 20 mg acid ascorbic și metaboliți denotă că ingestia acestuia a fost moderată, iar cantitatea de 10—13 mg reflectă limita dintre necesar și insuficient.

Copiii elimină prin urină sub 5 mg/zi de acid ascorbic. În cursul eforturilor fizice, acidul ascorbic se elimină prin transpirație aproximativ

Scanned with OKEN Scanner

1—2 mg/oră. Rinichiul prezintă un „prag de eliminare" situat între 1,1—1,8 mg/100 ml plasmă. În stare de carență ascorbică excreția acidului ascorbic se face aproape integral sub formă de metaboliți. În tratamente cu aspirină, piramidon, salicilați, barbiturice, se produce o creștere a eliminării acidului ascorbic, cu reducerea accentuată din organele de depozit, fără a declanșa scorbutul, datorită resorbției tubulare intense la nivele plasmatice scăzute (H.S. Loh și colab., 1974).

Necesități. Omul, primatele și cobaiul au neapărată nevoie de aportul alimentar al acidului ascorbic. Îndepărtarea acidului ascorbic din hrana maimuțelor și a cobaiului determină apariția scorbutului, după 2—3 săptămâni. Toate celelalte animale, cu excepția unor pești, păsări exotice, pot biosintetiza acidul ascorbic, unele mai greu (cornutele, porcii), altele mai ușor (șobolan, șoareci). O parte din acidul ascorbic este produs de flora intestinală. Dintre microorganismele florei intestinale care distrug acidul ascorbic fac parte *Escherichia coli, Salmonella sp.*, bacilul paratific, streptococii intestinali, *Proteus morgani* etc.

Copiii sub 6 luni și femeile în cursul sarcinii, au capacitatea de a biosintetiza acidul ascorbic. Femeile gravide elimină mai mult acid ascorbic decât cantitatea ingerată, datorită capacității fătului de a îl produce. Necesitățile în acid ascorbic depind de specie, starea de sănătate, de activitatea depusă, anotimpuri, regiunea geografică etc.

Necesitățile pentru omul adult în acid ascorbic sunt în jur de 1 mg/kg greutate corp/zi, respectiv 50—70 mg/zi, iar în zonele nordice chiar de 125 mg/zi. Dozele de 1,4—1,8 mg/kg greutate corp produc „saturarea" organismului în acid ascorbic. Dozele mari de acid ascorbic de 1 000 mg/zi date la om nu sunt recomandate deoarece produc unele efecte negative (C.M. VILSON și colab., 1974).

Necesitățile în acid ascorbic depind de oameni și de individualitatea enzimatică și metabolică a indivizilor, de vârstă, starea de sănătate, perioada de graviditate și lactație a femeilor, de bioritmuri, anotimpuri, regiuni geografice etc. În zonele cu climă temperată, alimentația din timpul iernii și primăverii este mai săracă în vitamina C prin lipsa produselor vegetale proaspete, pierderile care se produc prin păstrarea și conservarea alimentelor, fapt ce determină apariția unor hipovitaminoze trecătoare, care se manifestă prin „oboseala de primăvară". Unele persoane nu manifestă carența în vitamina C la un tratament prelungit cu 10 mg vitamină C pe zi, în timp ce alte persoane necesită 80—120 mg/zi, fapt ce reflectă mari variații individuale, determinate de individualitatea metabolică a acestora.

Necesitățile sugarului în acid ascorbic sunt de 30—50 mg/zi, iar a copilului de un an de 30 mg/zi, cantități mai mari ca la adult dacă acestea se raportează la greutatea corpului. Femeile gravide necesită 75—100 mg/zi, iar în perioada de alăptare 125 mg/zi. În stări de stres prin frig, în arsuri extinse, intervenții chirurgicale, în boli febrile (răceli, gripă, pneumonie) în tuberculoză etc., necesitățile cresc până la 250 mg/zi. Cantități similare sunt necesare și la pacienții care fac tratamente cu aspirină, care blochează preluarea vitaminei C de către leucocite și trombocite, în intoxicații, afecțiuni cancerigene, sub influența poluanților, a narcoticelor, medicamentelor barbiturice, antidepresive, precum și la utilizarea anticoncepționalelor orale.

Scanned with OKEN Scanner

17.8. ROL ŞI ACTIVITATE BIOCHIMICĂ

Vitamina C are un rol multiplu şi complex în organismele animale şi vegetale. Ea are un rol esenţial în formarea şi menţinerea integrităţii colagenului, în hematopoieză şi metabolismul fierului, influenţează activitatea diferitelor sisteme enzimatice cu rol fundamental în metabolismul glucidelor, lipidelor, protidelor, a aminoacizilor aromatici, hormonilor steroidici, în biosinteza şi funcţionarea acizilor folici. Vitamina C are de asemenea un rol deosebit de important în reacţiile de oxidoreducere, din organism, în activitatea creierului, ficatului, glandelor endocrine, în metabolismul acizilor graşi, a colesterolului şi a acizilor biliari, măreşte imunitatea organismului şi rezistenţa la infecţii, previne formarea unor substanţe cancerigene, inclusiv a nitrozaminelor în stomac.

17.8.1. ROLUL VITAMINEI C ÎN FORMAREA COLAGENULUI

Una din funcţiile biologice fundamentale a vitaminei C la om şi la animale o constituie reglarea formării şi menţinerii activităţii colagenului în matricea oaselor, cartilagii, dentină, endoteliul vaselor în ţesutul fibros, a substanţei intercelulare şi a ţesutului mezenchimatos. În carenţă de vitamina C celulele nu mai pot produce substanţe intercelulare ca oseina, dentina, colagen. Acţiunea vitaminei C se exercită în special asupra fibroblastelor care produc biosinteza colagenului. În condiţii normale, fibroblaştii sunt înglobaţi într-o substanţă cu structură amorfă, întretăiată de reticul, din care rezultă colagenul, printr-un proces de maturaţie. În carenţa de vitamina C, transformarea reticulului în colagen este întârziată sau oprită, iar fibroblaştii produc un colagen anormal. Experimentul s-a demonstrat că în procesul de formare a colagenului de către fibroblaşti, prezenţa vitaminei C este absolut necesară. Prin experienţe „in vitro" pe culturi de fibroblaşti s-a arătat că adăugarea de vitamină C măreşte viteza de formare a substanţelor intercelulare. În stări de hipovitaminoză C, cicatrizarea rănilor şi consolidarea fracţiunilor este mult întârziată din cauză că formarea fibrelor este mult îngreunată.

Vitamina C are un rol fundamental în formarea şi menţinerea integrităţii matricei intercelulare. Celulele din ţesuturi sunt incluse într-o substanţă fundamentală vâscoasă (matricea intercelulară), formată predominant din glicoproteide, mucopoliglucide, glucozamine. Această substanţă vâscoasă, izolează celulele de mediul ambiant, prin care trec substanţele care intră şi ies din celule. Prin polimerizare şi depolimerizare, masa vâscoasă influenţează activitatea celulelor vii şi invers. Moleculele din masa vâscoasă (glicoprotide, proteoglucani, glucozaminoglicani etc.) se unesc şi formează fibre tridimensionale de colagen, care reprezintă un adevărat „mediu intern". În compoziţia acestor fibre se găseşte acid hialuronic, condroitină, condroitinsulfaţi. Depolimerizarea matricei necesită activitatea unor glucozidaze (hialuronidaza), proteaze, colagenaze etc., care sunt controlate de vitamina C. În carenţă de vitamină C scade formarea colagenului, transformarea prolinei în hidroxiprolină şi formarea protocolagenului (peptidă), care prin procese de hidroxilare şi polimerizare se transformă în colagen.

Vitamina C este necesară nu numai activării unor enzime, hidroxilării prolinei şi altor aminoacizi, ci şi biosintezei mucopoliglucidelor şi

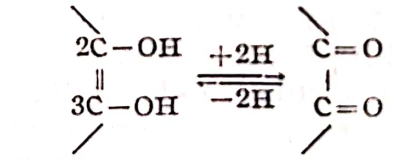
Scanned with OKEN Scanner

glicoproteidelor, substanțe de bază din constituția colagenului. La animalele scorbutice colagenul este mai sărac în condriotinsulfați. Vitamina C are un rol important în calcifierea dinților, în creșterea tonusului mușchilor netezi și în scăderea contractibilității mușchilor striați. Mărește rezistența organismelor la oboseală, frig, infecții, intoxicații, cancerizare etc. Acidul dehidroascorbic are un rol esențial în creșterea și diviziunea normală a celulelor. Vitamina C contribuie la menținerea integrității funcționale a țesutului conjunctiv prin stimularea biosintezei aminoglucidelor (galactozamină, glucozamină, manozamină etc.) hidrolizarea unor aminoacizi (prolină la hidroxiprolină, fenilalanină la tirozină etc.) incorporarea sulfaților în mucopoliglucide, biosinteza colagenului, în depolimerizarea acidului hialuronic, cu însemnate proprietăți antiscorbutice.

17.8.2. ROLUL VITAMINEI C ÎN REACȚIILE DE OXIDOREDUCERE

Datorită proprietăților vitaminei C de a trece reversibil din forma redusă (acid ascorbic), în forma oxidată (acid dehidroascorbic), ea are un rol esențial în lanțul oxidărilor celulare, funcționând ca un sistem oxidoreducător reversibil, asigurând astfel transportul hidrogenului și al electronilor de pe un substrat pe altul. Această capacitate de oxidoreducere reversibilă se datorește prezenței în moleculă a grupării funcționale dienolice la C-2 și C-3, care prin oxidare trece în grupare dicetonică. Trecerea reversibilă a acidului ascorbic în acid dehidroascorbic, determină principala activitate biochimică a vitaminei C.

$$\text{Acid ascorbic} \underset{-2H}{\overset{+2H}{\rightleftharpoons}} \text{Acid dehidroascorbic}$$



Acid ascorbic Acid dehidroascorbic

Capacitatea vitaminei C de a se oxida și reduce reversibil, cu o frecvență mare și cu o foarte mare ușurință, a determinat ca această vitamină să formeze în organism cel mai important sistem de oxidoreducere celular.

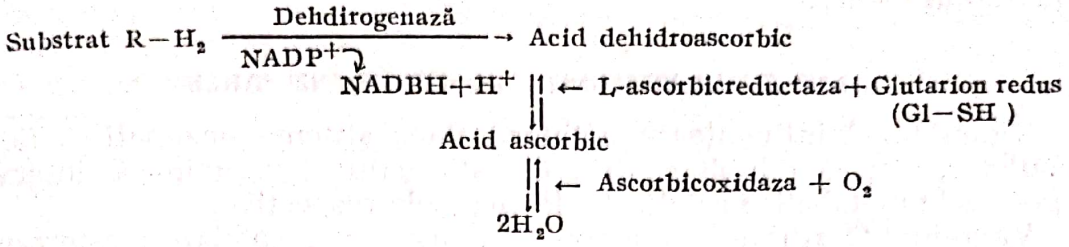
Oxidarea acidului ascorbic în țesuturi se poate efectua atât pe cale enzimatică, cât și pe cale neenzimatică. În plante există enzime specifice (ascorbicoxidaze) capabile să transmită hidrogenul substratului, direct oxigenului molecular, prin intermediul acidului ascorbic, formând astfel un sistem respirator independent de sistemul citocromic.

$$\text{Acid ascorbic} + 1/2\ O_2 \rightarrow \text{Acid dehidroascorbic} + 2\ H_2O$$

Ascorbicoxidaza conține cupru în moleculă și are o specificitate mare în raport cu gruparea endiol și cu forma L a substratului. Acidul dehidroascorbic sub acțiunea unor dehidrogeneze, în prezența glutationului redus și a enzimei L-dehidroacidascorbicreductaza este transformat în acid L-ascorbic, care sub acțiunea ascorbicoxidazei, transmite hidrogenul

Scanned with OKEN Scanner

substratului direct oxigenului molecular. Schema simplificată a acestor transformări se prezintă astfel:



Sistemele neenzimatice de oxidare a acidului ascorbic sunt stimulate de chinone, săruri de cupru și de fier etc. Enzimele, care catalizează indirect oxidarea acidului ascorbic sunt peroxidaza, catalaza, fenoloxidaza, citocromoxidaza.

Reducerea acidului dehidroascorbic are loc în organism de asemenea prin intermediul unor sisteme neenzimatice și enzimatice. În organism, acidul ascorbic predomină sub formă redusă, cu toate că este prezent oxigenul. În menținerea formei reduse a acidului ascorbic, un rol important revine glutationului, care și el formează un sistem oxidoreducător, prin trecerea sa reversibilă în diglutation.

$$2Gl-SH_2 \underset{+2H}{\overset{-2H}{\rightleftharpoons}} Gl-S-S-Gl$$

Glutation Diglutation

Numeroși cercetători susțin rolul protector al glutationului și al acidului ascorbic pentru menținerea lor în formă redusă, conform relației:

Acid dehidroascorbic + $Gl-SH_2 \rightleftharpoons Gl-S-S-Gl$ + Acid ascorbic

Aceste reacții se pot realiza prin acțiunea glutationreductazei și a dehidroascorbicreductazei.

Sistemul oxidoreducător acid ascorbic $\rightleftharpoons$ acid dehidroascorbic este implicat în numeroase procese de oxidoreducere, inclusiv în lanțul transportorilor de electroni în respirația tisulară. Acest sistem de oxidoreducere ia parte în numeroase procese metabolice, reglează potențialul de oxidoreducere celular și contribuie la transportul hidrogenului și a electronilor atât pe cale enzimatică, cât și neenzimatică.

Oxidarea acidului ascorbic „in vitro" are loc prin simpla expunere a acestuia la aer, fiind intensificată de chinone, tiroxină, Cu^{2+}, Fe^{3+} etc. Oxidarea acestuia în organism se realizează sub acțiunea ascorbidazei (ascorbază, acid ascorbic-oxidează sau ascorbicoxidază), care a fost obținută în stare cristalină din castraveți cu 0,25% Cu, precum și sub acțiunea indirectă a peroxidazei, catalazei, fenoloxidazei, citocromoxidazei etc. Ascorbicoxidaza acționează prin formarea unui radical liber, ca intermediar, fiind capabilă să oxideze și alți compuși înrudiți, acizii L-glucoascorbic, L-araboascorbic, L-galactoascorbic etc. Reducerea acidului dehidroascorbic se face cu ajutorul glutationului, cisteinei, homocisteinei etc, sub acțiunea dehidroascorbreductazei, identificată în plantele și semințele în stare de germinație, precum și în stafilococi, unde donorii de hidrogen sunt glucoza, acidul succinic, acidul piruvic etc.

În procesele de oxidoreducere reversibile, prin care se realizează transportul de hidrogen și electroni, acidul ascorbic poate fi convertit în

acid dehidroascorbic sau în acid monodehidroascorbic, conversia este însă parțială și limitată, stabilindu-se echilibru care depinde de condițiile de oxidare din mediu.

17.8.3. ROLUL VITAMINEI C ÎN SISTEME ENZIMATICE

Vitamina C influențează acțiunea unor sisteme enzimatice, fie ca stimulator, sau ca inhibitor. Prin această acțiune, vitamina C intervine în procesele metabolice catalizate de enzimele respective.

Vitamina C stimulează activitatea arginazei, catalazei, esterazelor, papainei, ß-amilazei (hepatice, pancreatice), catepsinele și inhibă ß-amilaza vegetală, polifenoloxidaza, xantinoxidaza, ureaza etc. Vitamina C manifestă o acțiune de protecție asupra fosfatazei și de menținere a grupărilor tiolice în formă redusă (-SH).

Mecanismele de activare a enzimelor constau în efectul protector al vitaminei C asupra grupărilor -SH implicate în numeroase reacții enzimatice. Activarea arginazei și a papainei se realizează numai în prezența ionilor feroși, datorită probabil formării unui complex „acid ascorbic — Fe^{2+}“, capabil să reducă legăturile disulfidice -S-S-inactive, la grupări -SH active. În scorbut, atât la om cât și la animale, se produce o scădere a fosfazazei alcaline serice și a fosfatazei osoase. Administrarea de vitamină C determină creșterea fosfatazelor la nivelul normal. În scorbut este scăzut de asemenea conținutul citocromoxidazei, fosforilazei, succinicodehidrogenazei, tirozinazei, hidroxilazelor, esterazelor etc.

Vitamina C reglează activitatea liozozomilor. În stare de hipovitaminoză C crește funcția „digestivă“ a lizozomilor. Prin labilizarea membranelor lor, se intensifică activitatea ribonucleazelor, dezoxiribonucleazelor, fosfatazelor acide etc., care stau la baza unor tulburări metabolice scorbutice. În stare carențială mai accentuată, crește permeabilitatea fibrelor musculare, apar hemoragii ale gingiilor. Creșterea permeabilității vasculare, o trăsătură caracteristică scorbutului, se datorește eliberării unor proteaze din lizozomi, precum și insuficienței colagenului și a stabilității sale.

Structura și funcționarea mitocondriilor depind în mare măsură de conținutul lor în vitamina C. La concentrații mici de vitamina C, sub 0,3 μg/g se produce „in vitro“ degradarea mitocondriilor. Se pare că în această situație liza mitocondriilor este determinată de peroxidarea lipidelor membranale. Aceste dereglări încetează la adăugarea unor cantități mai mari de vitamina C.

La mamifere, vitamina C participă în lanțul transportor de electroni din microzomi de la NADPH la citrocromul b_5 stimulând și procesele de hidroxilări. Administrarea de alcool, în ficatul șobolanului, deplasează echilibrul dintre NAD/NADH; acid lactic/acid piruvic; acid ascorbic/acid dehidroascorbic; NADP/NADPH etc., în favoarea formelor reduse.

17.8.4. ROLUL VITAMINEI C ÎN METABOLISMUL UNOR AMINOACIZI AROMATICI ȘI ÎN PROCESELE DE HIDROXILARE

Experimental s-a dovedit că administrarea unor cantități mari de fenilalanină sau tirozină la cobai cu scorbut, determină elimniarea prin urină a unor metaboliți anormali, cum sunt acidul p-hidroxifenilacetic

Scanned with OKEN Scanner

și p-hidroxifenilpiruvic, fapt ce denotă că s-a produs hidroxilarea aminoacizilor aromatici.

Pe cale experimentală atât „in vitro" cât și „in vivo", s-a dovedit participarea vitaminei C în hidroxilarea aminoacizilor aromatici (fenilalanină, tirozină) și heterociclici (triptofan, prolină), Vitamina C determină de asemenea transformarea acidului p-hidroxifenilpiruvic în acid homogentisinic și în desfacerea ciclului acestuia. La om, maimuță și cobai, care nu pot biosintetiza acid ascorbic, în carență de vitamina C se produce eliminarea prin urină a acidului homogentisinic (alcaptonurie). Hidroxilarea compușilor aromatici se realizează de vitamina C și „in vitro" la pH==6,7 și 37°C în prezența ionilor de Fe^{2+} și Fe^{3+}. Vitamina C participă și în procesele de transformare a tirozinei în adrenalină, respectiv în melanine.

Vitamina C stimulează transformarea triptofanului în serotonină (5-hidroxitriptofan), care reprezintă o amină biogenă însemnată, precum și hidroxilarea metaboliților triptofanici (kinurenină, acid antranilic, acid indolilacetic, așa cum s-a menționat anterior, în transformarea prolinei în hidroxiprolină, proces însemnat în biosinteza colagenului.

Vitamina C are un rol însemnat în hidroxilarea steroizilor, în biosinteza hormonilor steroizi și a acizilor biliari, la dehidrogenarea acizilor grași saturați și la biotransformarea unor medicamente, substanțe toxice, poluanți, compuși cancerigeni etc.

17.8.5. ROLUL VITAMINEI C ÎN METABOLISMUL ACIZILOR FOLICI

Vitamina C stimulează transformarea acidului folic în acid folinic, care este forma activă. S-a remarcat experimental, că la bolnavii cu scorbut, după administrarea de acid folic, se eliberează prin urină cantități reduse de acid folinic. În acest proces, vitamina C stimulează reacțiile de formilare și de reducere.

17.8.6. ROLUL VITAMINEI C ÎN METABOLISMUL FIERULUI ȘI ÎN HEMOGLOBINOGENEZĂ

Vitamina C intervine în metabolismul fierului prin metabolizarea ionului Fe^{3+} din feritină, pe care îl reduce la Fe^{2+}, ce va fi trimis apoi la hemenzime. În hemoglobinemie și sideremie redusă, administrarea de vitamina C determină o creștere a conținutului acestor substanțe. Vitamina C manifestă o influență deosebită în ce privește utilizarea fierului în biosinteza hemoglobinei. La maimuța aflată în stare carențială ascorbică, se produce o sângerare a gingiilor, scăderea numărului de eritrocite, scăderea la o treime a fierului plasmatic. La cobai, administrarea simultană a vitaminei C cu săruri feroase, determină o creștere a sideremiei și ascorbinemiei, superioară administrării numai a vitaminei C. Vitamina C are un rol însemnat în biosinteza hemoglobinei și a altor feroproteine, precum și în transportul fierului prin intermediul siderofilinei și în depozitarea sa sub formă de feritină.

Scanned with OKEN Scanner

17.8.7. ROLUL VITAMINEI C ÎN CREȘTEREA REZISTENȚEI ORGANISMELOR LA INFECȚII

Experimental s-a demonstrat că în stări de carență a vitaminei C scade foarte mult rezistența organismelor la infecții. Vitamina C scade atât „in vivo" cât și „in vitro" activitatea a diferite toxine. Oamenii, maimuțele și cobaii, care nu pot biosintetiza vitamina C sunt sensibili la infecțiile cu *Mycobacterium tuberculosis*. Oamenii bolnavi de tuberculoză, viroze respiratorii, afecțiuni gripale, aflați în diferite stări infecțioase, toxice și leziuni cutanante, au un conținut redus de vitamina C în leucocite, plasma sanguină și în diferite organe de depozit. Efectul protector al vitaminei C în asemenea afecțiuni este unanim recunoscut. Vitamina C are un rol activ și în procesele de fagocitoză, având un conținut ridicat la nivelul leucocitelor, în formarea anticorpilor, în general în toate procesele imunitare.

17.8.8. ROLUL VITAMINEI C ÎN STIMULAREA ACTIVITĂȚII UNOR HORMONI

Vitamina C are un rol important în biosinteza hormonilor steroidici, sexuali și corticosuprarenali. În zona corticală a glandelor suprarenale, conținutul vitaminei C este mare, de 4 — 5 mg/g. Stările de stres apărute prin frig, infecții, poluanți, solicită activitatea zonei corticale, crescând astfel necesitățile în vitamina C. Administrarea unor hormoni steroidici reduc conținutul vitaminei C din glandele suprarenale. Animalele aflate în stare carențială au o capacitate scăzută de biosinteză a hormonilor steroidici (corticosuprarenali și sexuali) și a acizilor biliari. Crește nivelul sanguin și excreția urinară a hormonilor de tip dozoxicorticosteronă și a metaboliților acestora (17-cetosteroizi). Vitamina C controlează menținerea la valori normale a raportului NAD/NADH, care determină activitatea dehidrogenazelor implicate în biosinteza hormonilor steroidici. În timp ce NAD^+ stimulează biosinteza 17-dezoxicorticoizilor, NADH stimulează producerea de 17-hidroxicorticoizi și inhibă transformarea pregnenolonei în progesteronă. În scorbut, raportul NAD/NADH este mult mai mic atât în glandele suprarenale cât și în ovare, având consecințe degradarea foliculilor și atrofia corpilor galbeni, instalarea sterilității.

În esență, rolul vitaminei C asupra hormonilor constă în participarea la biosinteza adrenalinei, stimularea secreției de hormoni corticosuprarenali și sexuali, a insulinei, de pancreas, dar inhibă activitatea glandelor tiroidiene (L. Ababei, M. Trandafirescu, 1974).

17.8.9. ROLUL VITAMINEI C ÎN METABOLISMUL GLUCIDELOR ȘI A ALTOR SUBSTANȚE

La cobai scorbutici se remarcă o scădere a capacității acestora de a metaboliza glucoza. Scade conținutul glicogenului din ficat, datorită scăderii secreției de insulină în pancreas și apare glicozurie. La animalele carențate în vitamina C hormonii corticosuprarenali nu stimulează neoglucogeneza și se remarcă dereglări la nivelul ciclului Krebs. Se formează o cantitate mai mare de acid α-cetoglutaric.

Scanned with OKEN Scanner

Vitamina C are un rol însemnat în metabolismul glicoproteidelor, care este dereglat în stări de scorbut, datorită inactivării hialuronidazelor, enzime de depolimerizare specifice, care prin depolimerizarea acidului hialuronic ar elibera glucidele din componența acestuia.

Vitamina C influențează în mod hotărâtor metabolismul tirozinei și a altor aminoacizi aromatici (fenilalanina, dihidroxifenilalanina) și heterociclici. Administrarea tirozinei la cobaii scorbutici determină o eliminare de acizi homogentisinic, p-hidroxifenilpiruvic, p-hidroxifenilacetic, fapt ce indică o oxidare incompletă a tirozinei. Aceste fenomene nu au loc dacă se administrează tirozină împreună cu vitamina C. Se pare că vitamina C funcționează ca o coenzimă a tirozinazei, acționând în faza cetoacidului corespunzător până la stadiul acidului acetilacetic. Dereglarea metabolismului tirozinei la oamenii cu scorbut se manifestă și printr-o pigmentație accentuată a pielii și apariția tipului de alcaptonurie (tirolizurie).

Vitamina C stimulează oxidarea acizilor grași. Are acțiune antioxidantă și protejează de degradări oxidative vitaminele A, E, F, glutationului etc.

Vitamina C îndeplinește rolul de activator general al metabolismului celular. Ia parte la formarea și funcționarea țesuturilor, la menținerea elasticității celor de legătură.

Vitamina C are puține proprietăți farmacologice, în sensul strict al termenului și chiar aceste proprietăți sunt strâns corelate cu funcția sistemului acid ascorbic — acid dehidroascorbic.

17.9. HIPOVITAMINOZE ȘI HIPERVITAMINOZE

Plantele, majoritatea animalelor și numeroase microorganisme își pot procura pe cale endogenă vitamina C necesară diverselor procese metabolice. Omul, cobaiul și maimuța, parțial căprioara, unele păsări și pești exotici își procură vitamina C în cea mai mare parte prin hrană și în cantitate relativ redusă prin flora intenstinală. În aprecierea necesităților în vitamina C a organismelor este necesar să se țină seama că alimentele pierd prin păstrare îndelungată cantități destul de mari de vitamina C, precum și în procesele de conservare și pregătire culinară, astfel încât majoritatea organismelor animale au nevoie de un aport exterior continuu de vitamina C. Fumatul reprezintă un factor de risc, care mărește deficiențele în conținutul vitaminei C. Fiecare țigară micșorează rezervele de acid ascorbic în organism deoarece consumă o anumită cantitate din această vitamină. Starea precarențială se manifestă prin oboseală, slăbirea organismului, insomnii, iritabilitate, slăbirea rezistenței la infecții. Deficiențele mai mari în acid ascorbic determină apariția scorbutului care este o boală caracteristică acestei avitaminoze. Scorbutul este rezultatul unei avitaminoze multicarențiale, datorită asocierii avitaminozei C cu avitaminoza P.

Simptomele scorbutului sunt multiple, de la anemie și astenie marcată, la hemoragii cutanante, musculare, subperiostale, urmate de inflamații și dureri în oase, pierderea dinților, oprirea creșterii tulburări în structura sistemului muscular și nervos etc.

Scanned with OKEN Scanner

DAN BEDELEANU arată că în avitaminoza experimentală, efectuată pe voluntari, supuși unui regim alimentar lipsit de vitamina C, timp de 26 — 180 de zile, se remarcă în primele săptămâni o scădere a conținutului de vitamină C din sânge și leucocite, fără manifestări clinice. Între 2 — 6 luni apar semnele caracteristice ale scorbutului, care se manifestă prin alterări capilare și vasculare, cu apariția de hemoragii cutanante (pete roșii), hemoragii gingivale, conjunctivale, nazale și la nivelul limbii. Apar apoi hematoame, echimoze (hemoragii la nivelul pielii), hematurie etc. Afecțiunile dermice se manifestă prin keratoză și hipertrofia foliculilor, care prin vascularizare crescută produc mici hemoragii care se manifestau sub forma unor erupții de mici papule roșii. Se produce friabilitate și căderea părului, acnee, sclerodermine, piele solzoasă, pigmentarea brună sau purpurie a pielii, uscăciunea cavităților bucale, nazale, faringiene, salivație scăzută, apariția cariilor dentare, hipoaciditate gastrică, insuficiență pancreatică etc. Fragilitatea anormală a peretelui capilar produce hemoragii la nivelul unor țesuturi și organe, ca gingiile și mucoasele gurii, gastro-intestinale, la nivelul mușchilor și a țesuturilor subcutanante etc., iar după un timp apar ulcerații și chiar gangrenemie, anemie hipocromă, fibrinogen crescut, hipofuncție ovariană. Apar apoi alterări ale ligamentelor, oaselor și mușchilor, durerea membrelor, demineralizarea oaselor etc.

Tulburările osoase se manifestă prin încetinirea dezvoltării oaselor, osteoporoză, vindecarea lentă a fracturilor, calcifierea anormală a ligamentelor, alterări la joncțiunea diafizelor și epifizelor, tulburări periarticulare etc.

Tulburările dentare se caracterizează prin subțierea emailului dentar, modificare patologică a odontoblaștilor și a dentinei, a ligamentelor peridentare, apariția cariilor, inflamarea și sângerarea gingiilor, căderea dinților. Apar apoi alterări la nivelul aparatului respirator, predispoziție la răceală, gripă, amigdalită, dispnee, sensibilitatea mucoasei bucale.

Tulburările sistemului nervos sunt intense în avitaminoza C. Ele se manifestă la cobai prin modificări degenerative la nivelul sistemului nervos central și periferic. Apar hemoragii în creier și în măduva osoasă. Se produce o creștere a cerebrozidelor și o scădere accentuată a sfingomielinelor. La oameni apare oboseala, surmenajul, letargie, depresii, anxietate, hipocondrie. Apar pierderi în greutate și numeroase edeme.

Avitaminoza C apare la sugarii hrăniți cu lapte de vacă fiert în cantitate mare. Formele grave se manifestă prin tulburări osoase cu stern deformat, tulburări circulatorii, hemoragii, infecții, dermatite, hemoragii meningiale și la nivelul ochilor, dureri mari la mers, datorită presării. Aceste forme grave sunt în prezent inexistente, ca de altfel scorbutul la oamenii maturi, formele ușoare apar însă la copiii subalimentați sau hrăniți artifical, cu alimente fierte.

Hipovitaminoza C se manifestă la copii prin încetarea creșterii, subfebrilitate, anemie hipocromă, edeme, tulburări digestive, leziuni osoase, hemoragii, gingivite etc. Formele mai ușoare se manifestă prin paliditate, oboseală, anemie, cianozare la buze, nas, urechi, unghii, apariția hemoragilor la presare, paradontoză, dureri la mers, hemoragii gingivale etc. Aceste afecțiuni pot fi tratate printr-o alimentație bogată în vitamina C, folosirea de sucuri naturale și preparate farmaceutice.

Scanned with OKEN Scanner

Carența latentă în vitamina C se manifestă la adulți prin lipsa poftei de mâncare, apatie, iritabilitate, astenie, mai ales primăvara, dureri reumatismale la oase și articulații, anemie hipocromă, piele uscată și rugoasă, hemoragii etc. Apare așa numitul „scorbut al burlacilor" datorită consumării în cantitate mare a alimentelor uscate și conservate (MARTIN și colab., 1985).

În formele grave de scorbut se produce deschiderea cicatricelor vechi, a plăgilor, gangrene, decalcifieri, leziuni nervoase.

Tulburările care apar inițial sunt reversibile. Ele cedează la o hrană bogată în vitamina C sau la tratamente medicale. Cele care apar după o perioadă lungă de carență, majoritatea sunt ireversibile și persistente, ducând la apariția unor complicații secundare. Unele persoane obeze folosesc formele ușoare ale scorbutului experimental pentru slăbirea în greutate a corpului.

Scorbutul foarte rar se semnalează în zilele noastre. Apare totuși la unele persoane subnutrite, la indivizii condamnați la ani îndelungați de închisoare, precum și în urma unor tulburări grave de absorbție. În secolele anterioare era o boală frecventă, mai ales la marinarii care călătoreau mult pe mări și oceane, la populațiile nordice care nu consumau fructe și legume proaspete.

Hipervitaminoze. Acidul ascorbic este suportat de organismul uman și animal în doze mari, fără urmări toxice. Încercări făcute de a determina o hipervitaminoză C la voluntari, nu au dat rezultate negative nici după 4 g pe zi. Nu se cunoaște o hipervitaminoză C naturală la om și animale, întrucât excesul obținut prin alimente sau microflora intestinală, după saturarea organismelor și țesuturilor, se elimină prin urină. Resorbția vitaminei C la nivelul tubilor contorți are o viteză limitată, iar excesul secretat de glomeruli trebuie să se elimine. S-a confirmat experimental pe cobai, că aceștia tolerează zilnic doze de 500 — 1 000 de ori mai mari decât necesarul normal (4 — 5 mg/kg greutate corp), fără să apară efecte negative. La fel se comportă și șobolanii și șoarecii. La iepuri, după 4 săptămâni de administrare parentală a vitaminei C în doze zilnice de 200 mg/kg greutate corp, au apărut hemoragii cutanate, fără alte manifestări. Șobolanii tratați zilnic cu doze de acid ascorbic de 6,5 g/kg greutate corp, 6 săptămâni și cu doze de 2 g/kg greutate corp timp de 2 ani, nu au manifestat simptome patologice față de lotul martor. Acidul ascorbic are un larg domeniu de toleranță la animale. După o perioadă îndelungată de administrare a unor doze mari de acid ascorbic, apar unele semne de toxicitate. Cantitatea de acid ascorbic administrată oral, subcutanat și intravenos care produce toxicitate 50% la animale (DL_{50}) este următoarea pentru diferite animale, în mg/kg corp:

Specia	Mod de administrare		
	Oral	Subcutanat	Intravenos
Șoarece	8 021	500	1 058
Șobolan	>5 000	5 000	1 000
Cobai	>5 000	1 000	500
Iepure	>2 000	>1 000	>1 000
Pisică	>1 000	>500	>500
Câine	>5 000	>300	>500

Scanned with OKEN Scanner

La oameni, chiar doze mijlocii de vitamina C administrate o perioadă îndelungată pot să determine insomnii, stări de excitație, dureri musculare, diaree, tulburarea metabolismului hidric la bătrâni, favorizarea formării calculilor în special a celor de oxalați. La doze mari pH-ul urinii este net acid. La anumite persoane apare greața, cefalee, bradicardie și creșterea numărului de trombocite. Se produce alterarea dinților și apar boli alergice. Acidul ascorbic are proprietăți laxative în doze mari.

17.10. INTERRELAȚII VITAMINICE

Vitamina C reglează nivelul sanguin și tisular al vitaminei A și previne apariția hipervitaminozei A. La rândul său, vitamina A stimulează activitatea biologică a vitaminei C.

În carența vitaminei A scade conținutul vitaminei C din plasmă și țesuturi. În hipervitaminoză A scade de asemenea conținutul vitaminei C din sânge, ficat, creier, contribuind la ameliorarea acestei hipervitaminoze.

Datorită caracterului său antioxidant puternic, acidul ascorbic are o acțiune de protecție a vitaminelor A, D, E, asupra degradărilor oxidative ale acestora și un efect de menajare asupra vitaminei B_2.

La cobai, α-tocoferolul determină creșterea conținutului acidului ascorbic în ficat și în glandele suprarenale, iar vitamina C ameliorează simptomele care apar în carența de vitamina E. În carența de riboflavină se poate normaliza metabolismul triptofanului prin administrarea de 2% acid ascorbic.

Biosinteza vitaminei C este stimulată de tiamină, riboflavină, acid pantotenic. Vitamina C stimulează transformarea acidului folic în acid folinic și excreția urinară a acestora. Are efect favorabil asupra șobolanilor și puilor de găină carentați în folați, dar nu vindecă anemia. Vitamina C este eficientă în stimularea creșterii organismelor aflate în carență B_1. Administrată în doze mari de 2 — 3 g/zi, ameliorează simptomele carențiale ale diferitelor vitamine. Suprimă tulburările endocrine de creștere în carența acidului pantotenic, dar nu vindecă alterările dermice. Experimental s-a stabilit că atât carența în vitamina C, cât și în tiamină, reduc capacitatea de oxidare fosforolitică, ambele vitamine au putere reducătoare în țesuturi și se pot substitui între ele. S-a demonstrat că vitamina C protejează șobolanul de efectele carenței în tiamină. Administrarea de vitamine B_1 și B_2, nu influențează evoluția scorbutului la persoanele bolnave, iar în carența tiaminică nu se produc modificări la nivelul ascorbemiei.

Carența sau excesul în nicotinamidă nu influențează conținutul vitaminei C din glandele suprarenale, ficat, creier etc. Complexul acid ascorbic — nicotinamidă denumit „niscorbamină", este mai eficient în saturarea organelor și țesuturilor cu vitamina C, decât forma liberă a acestei vitamine.

Vitamina C are acțiune sinergică cu colina în unele procese metabolice. Între vitaminele C, D și calciu se stabilește un anumit „echilibru", care are eficiență maximă în formarea și dezvoltarea țesutului osos și a dinților. Insuficiența sau excesul dintre acești factori perturbă dezvoltarea oaselor și a dinților.

Scanned with OKEN Scanner

17.11. ANTIVITAMINE C

Dintre analogii structurali ai vitaminei C cu acțiune antivitaminică, cel mai frecvent utilizat în cazuri experimentale este acidul D-glucoascorbic (fig. 17.6), care administrat la șoarece produce simptome similare scorbutului. Se știe că șoarecele nu are nevoie de aport exterior de vitamina C. Aceste simptome nu dispar prin administrarea de vitamina C, dar dispar după încetarea administrării de acid D-glucoaspartic. La cobai, care nu pot biosintetiza vitamina C, simptomele scorbutice provocate de acidul D-glucoaspartic sunt îndepărtate prin administrarea de vitamină C.

17.12. PRINCIPII TERAPEUTICE ȘI PREPARATE FARMACEUTICE

Preparatele cu vitamina C se utilizează în stări de hipo- sau avitaminoză C, în special în prevenirea și tratarea scorbutului. Ele se folosesc și ca adjuvant valoros în tratamentul afecțiunilor cardiovasculare (insuficiență cardiacă, hipertensiune), pentru refacerea permeabilității și rezistenței vaselor sanguine. De asemenea, se folosesc frecvent în diferite boli ale sistemului respirator cum sunt virozele, pleurezii, pneumonie, astm bronșic, tuberculoză, etc. O largă utilizare au preparatele cu vitamina C în tratarea anemiilor, afecțiunilor hepatice și digestive, în afecțiuni neurologice, în bolile reumatismale, în afecțiunile bucodentare și otorinolaringologice precum și în tratamentul bolilor infectocontagioase, în bolile endocrine (diabet), în stări postoperatorii și în convalescență. Tratamentele cu vitamina C dau rezultate bune în vindecarea tulburărilor de creștere la copii, în astenie, iar la gravide în iminența de avort și în perioadele de lactație. Vitamina C este utilă și în tratarea stărilor de șoc, a plăgilor, arsurilor, în stările de stres, răceli, gripe, viroze, în stările de astenie, la eforturi fizice intense. Efecte favorabile are vitamina C și în tratarea alergiilor, intoleranța la unele medicamente pentru mărirea rezistenței organismului la infecții, intoxicări, agenți poluanți, agenți mutageni și cancerigeni etc.

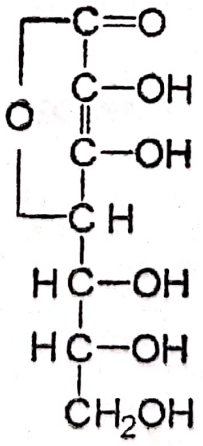


Fig. 17.6. Structura acidului D-glucoascorbic

Scanned with OKEN Scanner

Vitamina C se dă sub formă de fiole (200 sau 500 mg), comprimate efervescente (500 mg vitamina C), granule efervescente etc. Tabletele conțin în mod curent 50 mg vitamina C/tabletă. În fiole, acidul ascorbic se găsește frecvent sub formă de săruri de sodiu și conțin stabilizatori (cisteină). Există și fiole cu ascorbat de calciu, folosit pentru calcifierea oaselor și ascorbat de fier, utilizat în tratarea anemiilor. Există de asemenea sucuri de fructe cu conținut ridicat de vitamina C. Calea de administrare este cea orală, intramusculară și intravenoasă.

Redoxonul este un preparat farmaceutic utilizat ca tonic, având proprietăți antiinfecțioase, pentru mărirea rezistenței organismului în activități fizice și intelectuale, inactivarea substanțelor toxice, stimularea biosintezei anticorpilor, întărirea capacității aparatului imunitar, în stimularea diurezei etc. Se găsește sub formă de soluții 20%, tablete (500 mg vitamina C), tablete efervescente (1 g vitamina C), capsule (500 mg vitamina C).

Noile cercetări recomandă utilizarea cu predilecție a vitaminei C în tratamentul bolilor infecțioase și a cancerului, în scăderea concentrației colesterolului, detoxificări și în imunoterapie. Vitamina C este folosită de asemenea în tratarea bolilor reumatismale, în reînnoirea colagenului și formarea calusului la oasele rupte, pentru oprirea hemoragiilor în asociere cu vitamina K.

Vitamina C, având un potențial de oxidoreducere ridicat, conturbă reacțiile pentru demonstrarea prezenței glucozei în urină și nivelului acesteia în urină și sânge, dar nu afectează glicemia.

Scanned with OKEN Scanner

Capitolul 18. VITAMINE P

18.1. Scurt istoric 429
18.2. Structură şi reprezentanţi 430
18.2.1. Structura flavonoid-glicozidică 430
18.2.2. Hesperidina 432
18.2.3. Eriodictina 432
18.2.4. Rutina 433
18.2.5. Cvercitrina 433
19.2.6. Mecanism de acţiune. 434
18.3. Proprietăţi, metode de identificare şi dozare 435
18.4. Răspândire în natură, metabolism şi necesităţi 436
18.5. Rol şi activitate biochimică 437
18.6. Hipovitaminoze, hipervitaminoze, principii terapeutice şi preparate farmaceutice 439

Vitaminele P sunt formate dintr-un amestec de glicozide naturale care au ca aglicon pigmenţi flavonoidici, în special flavone şi derivaţii acestora. Se găsesc larg răspândite în plantele superioare, însoţind vitaminele C în fructele citrice, măceşe, coacăze negre, frunze.

Vitaminele P au acţiune sinergică cu vitamina C în numeroase procese metabolice. Ele micşorează fragilitatea vaselor sanguine şi permeabilitatea capilarelor, fapt pentru care se mai numesc şi vitaminele permeabilităţii, de la care derivă şi denumirea lor de vitamine P.

18.1. SCURT ISTORIC

În 1936, *Rusznyak* şi *Szent Györgyi* au observat că simptomele scorbutului, în special fragilitatea şi permeabilitatea crescută a capilarelor sanguine, precum şi anumite tipuri de purpură la om, nu sunt complet îndepărtate prin administrarea de acid ascorbic sintetic. Tot aceşti autori au arătat că prin folosirea sucului de lămâie şi a altor surse naturale bogate în vitamina C (ardei roşu) se îndepărtează simptomele scorbutului, se restabileşte elasticitatea vaselor sanguine, fapt ce i-a determinat să presupună că în sucul de lămâie şi în alte substanţe naturale bogate în vitamina C, există substanţe cu acţiune vitaminică, diferite ca structură de acidul ascorbic. Aceste substanţe, reunite ini-

țial sub numele de „citrine", deoarece se găsesc în cantitate mai mare în sucul fructelor citrice, au fost ulterior denumite vitamine P, de la efectul favorabil ce-l au asupra fragilității și permeabilității crescute a capilarelor (P — vitamina permeabilității). Întrucât substanțele din sucul de lămâie însoțesc vitamina C în diferite produse naturale și completează efectele vitaminei C în tratarea scorbutului, au fost numite și vitamina C_2, sau vitamină satelit a acidului ascorbic, respectiv „factorul permeabilității". Deoarece vitaminele P sub aspect chimic reprezintă un amestec de compuși din clasa flavonoidelor se mai numesc și vitamine flavonoidice sau bioflavonoide.

18.2. STRUCTURĂ ȘI REPREZENTANȚI

18.2.1. STRUCTURA FLAVONOID-GLICOZIDICĂ

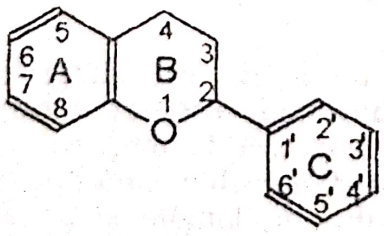
Sub aspect chimic, vitaminele P sunt glicozide care au ca și aglicon, pigmenți din clasa flavonoidelor, larg răspândite în regnul vegetal.

Flavonoidele sunt pigmenți fenolici care conțin în molecula lor un heterociclu piranic (B) sau furanic, condensat cu un inel benzenic (A). De heterociclu se cuplează un nou ciclu benzenic (C). Inelele au grupări hidroxilice, ceea ce determină caracterul fenolic al acestor pigmenți (fig. 18.1).

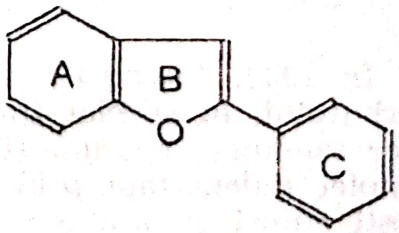
Flavonoidele se găsesc în cantitate mai mare în plantele superioare (flori, fructe, frunze, tulpini, rădăcini etc.), iar în cantitate mai mică în alge, în unele insecte și în animalele inferioare. Majoritatea flavonoidelor sunt colorate (flavone, antociani, calcone, aurone) și contribuie în mare parte la determinarea culorii florilor și a fructelor.

Cele mai importante vitamine P au ca aglicon pigmenți din clasa flavonoidelor (I) sau a izoflavonelor (II), care derivă de la 2-fenil-benzopironă și respectiv 3-fenil-benzopironă (fig. 18.2).

Flavonele și izoflavonele sunt pigmenți glabeni, hidrosolubili, larg răspândiți în plantele superioare. Ele conțin pe inelele A și C grupări hidroxilice și se găsesc în natură sub formă de glicozide. Se cunoaște structura a peste o sută de flavone. Dacă pe inelul heterociclic (B) se găsesc grupări hidroxilice, pigmenții se numesc flavanoli și respectiv izoflavanoli.

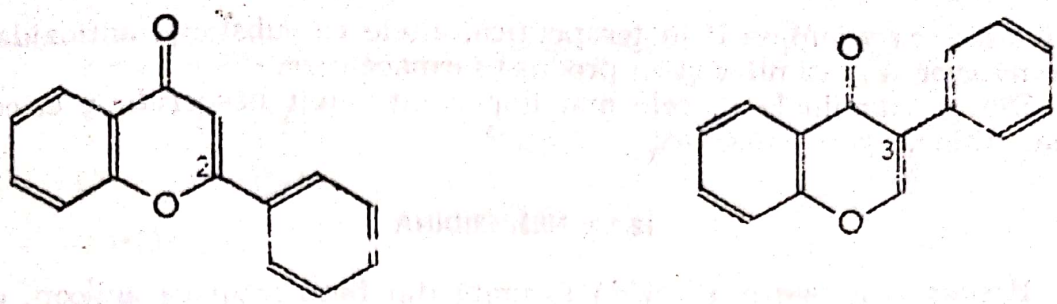


Structură flavonoidică
" piranică "



Structură flavonoidică
" furanică "

Fig. 18.1. Structura flavonoidelor



2 - fenilbenzopironă
(Flavonă)

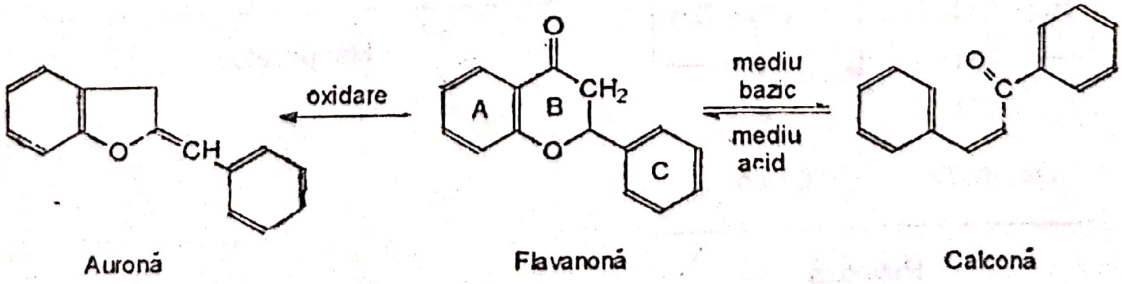
3 - fenilbenzopironă
(Izoflavonă)

Fig. 18.2. Cele mai importante vitamine P

Flavonele şi izoflavonele sunt substanţe cristaline, de culoare galbenă, solubile în apă şi alcool. În mediu alcalin, inelul piranic se deschide şi se formează dicetone. Flavonele au maxime de absorbţie cuprinse între 335—350 nm, iar flavanolii între 360—380 nm.

Flavonele şi izoflavonele formează cu metalele complecşi care măresc varietatea culorii florilor. Ele protejează în organism oxidarea vitaminei C şi a adrenalinei. Absorb radiaţiile ultraviolete şi protejează citoplasma, clorofila şi alte substanţe biologic active de aceste radiaţii. Prin reducerea dublei legături dintre C-2 şi C-3, flavonele se transformă în flavanone, pigmenţi incolori datorită întreruperii sistemului cromoforic. În mediu bazic flavonele se transformă în calcone, care în mediu acid se ciclizează şi refac flavonele. Prin oxidare, flavonele trec ireversibil în aurone, care au o culoare galben-aurie intensă şi se găsesc în florile unor compozite (fig. 18.3). Flavonele se transformă în calcone prin ruperea legăturii dintre atomul de oxigen şi atomul de carbon C-2. Calconele sunt substanţe puternic reducătoare, cu tendinţă de a reveni în celule la forma originală ciclică. Acest mecanism contribuie fără îndoială la activitatea biochimică a unor vitamine P.

Flavonele, calconele şi aurcnele intră şi ele ca agliconi în constituţia unor glicozide cu acţiune vitaminică P. Prezenţa flavonelor şi a derivaţilor acestora în plante, măreşte rezistenţa acestora la atacul insectelor şi al microorganismelor. Ele influenţează gustul, aroma şi stabilitatea unor preparate alimentare. Formează în celule sisteme de oxidoreducere, care au un rol însemnat în organism. Unele flavonoide



Auronă Flavanonă Calconă

Fig. 18.3. Structura flavanonelor

Scanned with OKEN Scanner

se folosesc ca vitamine P în terapeutică, altele ca substanțe antioxidante la conservarea grăsimilor și ca produse farmaceutice.

Dintre vitaminele P, cele mai importante sunt hesperidina, eriodictina, rutina, cvercitrina etc.

18.2.2. HESPERIDINA

Hesperidina este o glicozidă formată din hesperetol ca aglicon, glucoză și ramnoză ca și componente glucidice (fig. 18.4).

Hesperidina (sau hesperidozidul) a fost izolată încă din 1876 din portocale și lămâi verzi. Ramnoza și glucoza se unesc printr-o legătură 1,6-α-glicozidică. Legătura dintre glucoză, respectiv rutinoză (diglucid format din ramnoză și glucoză) și hesperetol se realizează tot printr-o punte glicozidică între hidroxilul de la C-1 al glucozei și hidroxilul de la C-7 al hesperetolului. Hesperidina este deci o 5,7,3'-trihidroxi-4'-metoxi-flavanonă. Se prezintă sub formă de cristale prismatice, slab gălbuie, cu punct de topire la 285°C. Este insolubilă în apă, eter, cloroform și acetonă, slab solubilă în alcool, ușor solubilă în piridină și soluții alcaline. În soluții alcaline prezintă în UV benzi de absorbție la 287 și 300 nm. În soluție piridinică este levogiră, având unghiul de rotație a luminii polarizate la (—)74,3°.

18.2.3. ERIODICTINA

Eriodictina este formată din L-ramnoză și eriodictiol unite printr-o legătură glicozidică la C-1 și C-7 (fig. 18.5).

Eriodictiolul se deosebește de hesperetol prin înlocuirea grupării metoxilice de la C-4' cu o grupare hidroxilică. Eriodictina însoțește în produsele naturale hesperidina. În soluție, între aceste vitamine se stabilește un echilibru. Eriodictina se prezintă sub forma unui lichid. Este puternic solubilă în apă și alcool și nu s-a obținut sub formă cristalină. În mediu alcalin prezintă benzi de absorbție la 263 și 320 nm.

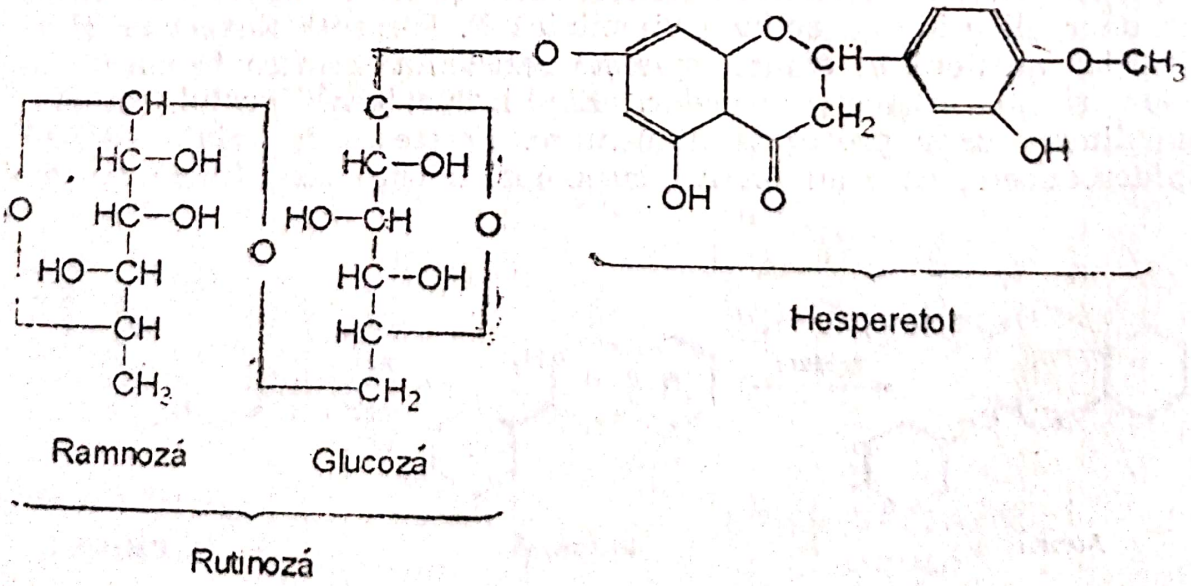


Fig. 18.4. Structura hesperidinei.

Scanned with OKEN Scanner

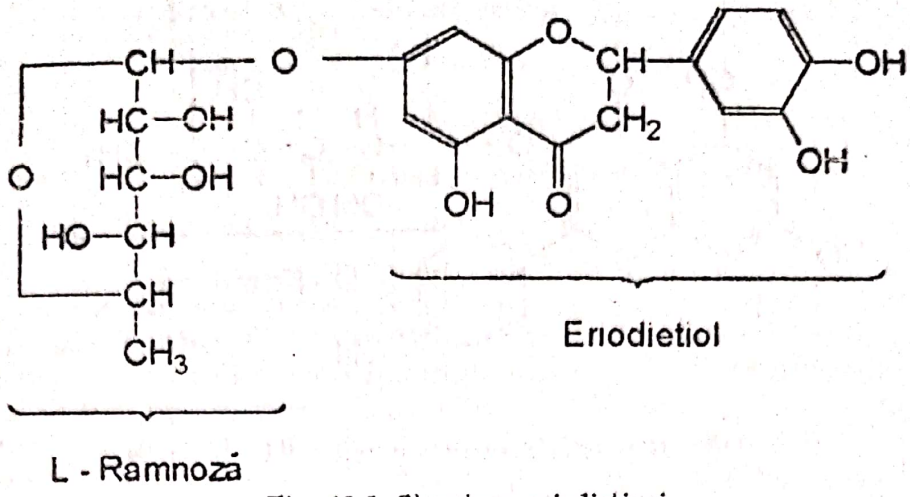


Fig. 18.5. Structura eriodictinei

18.2.4. RUTINA

Rutina este o glicozidă formată din cvercetol ca aglicon și rutinoză, cu legătura glicozidică la C-3 al heterociclului. Sub aspect chimic cvercetolul este un flavanol (fig.18.6).

Rutina s-a extras din tutun și hrișcă. Sub aspect structural este 3,5,7,3',4'-pentahidroxiflavanol, cu o catenă laterală formată din rutinoză, legată glicozidic de hidroxilul de la C-3. S-a izolat inițial din fructe citrice, fiind ulterior identificată în numeroase plante în frunze, fructe, rădăcini. Rutina este utilizată ca medicament.

18.2.5. CVERCITRINA

Cvercitrina este o glicozidă formată din cvercetol ca aglicon și ramnoză, unite prin legătură C-3 — C-1' (fig. 18.7).

Cvercetolul este un flavanol cu structura 3,5,7,3',4'-pentahidroxi-

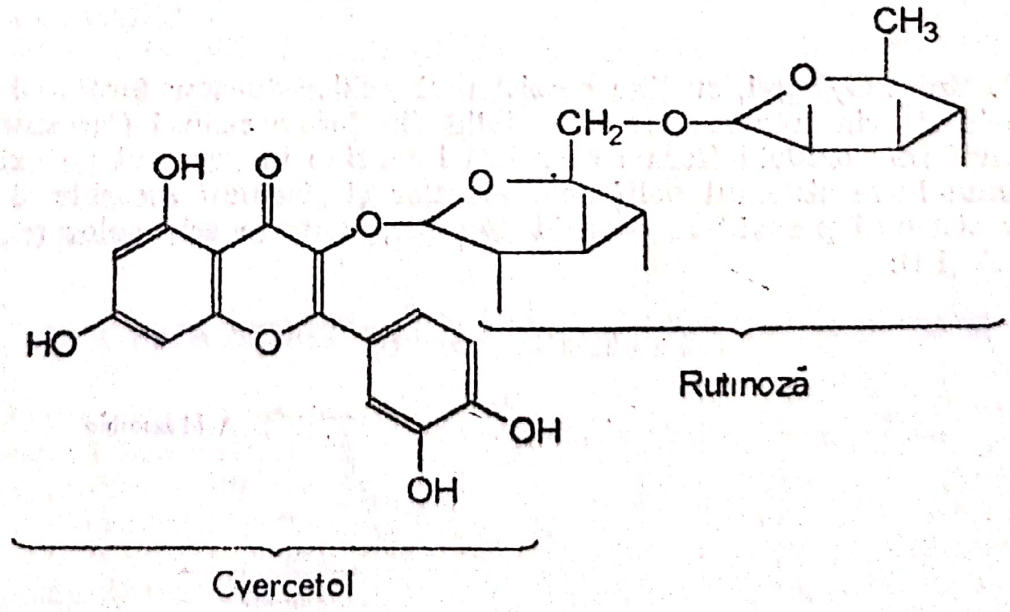


Fig. 18.6. Structura rutinei

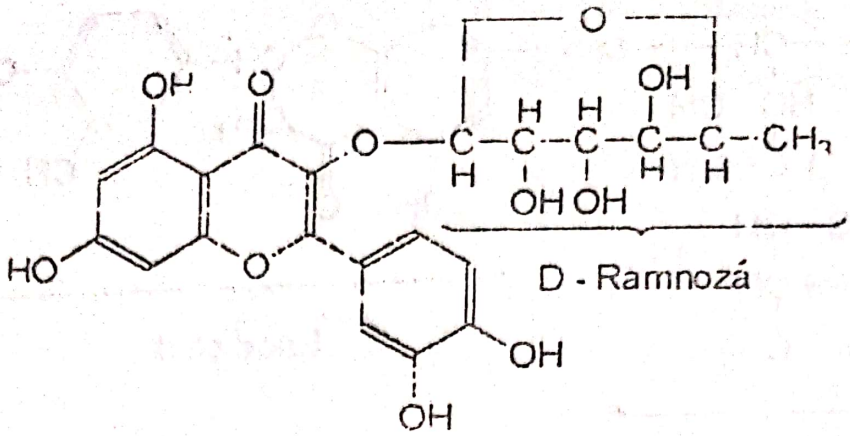
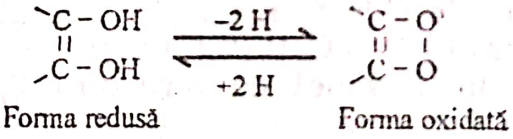


Fig. 18.7. Structura cvercitrinei

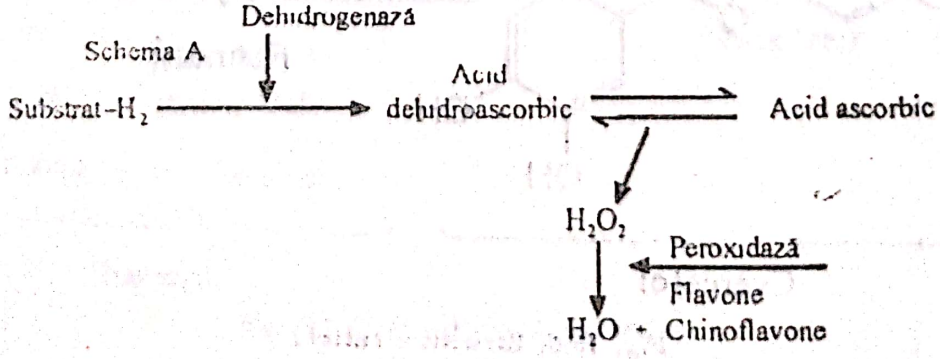
flavanol, care se mai numește și cvercetină. Se cunosc în prezent peste 300 de compuși flavonoidici cu acțiune vitaminică P mai mult sau mai puțin remarcabilă.

18.2.6. MECANISM DE ACȚIUNE

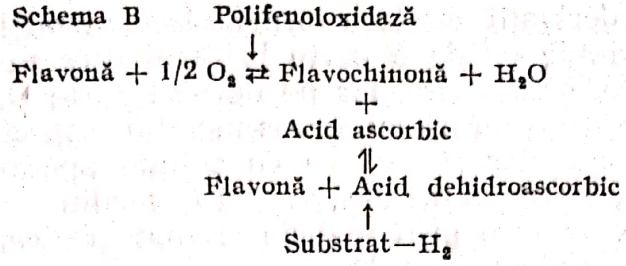
Partea activă din structura vitaminelor P o constituie hidroxilii fenolici, mai ales cei care se găsesc în poziție orto pe inelul C. Aceștia prin oxidare pot trece cu ușurință în chinonele respective, numite flavochinone, formând astfel un sistem de oxidoreducere reversibil fenoli ⇄ chinone, care funcționează în sinergism cu sistemul oxidoreducător acid ascorbic — acid dehidroascorbic.



A. Szent-Györgyi, susține că sistemul oxidoreducător format de vitaminele P prin trecerea lor reversibilă din forma redusă (forma fenolică) în forma oxidată (forma cetonică) intervine în procesul de oxidare la plante între sistemul polifenoloxidazelor și sistemul ascorbic și respectiv sistemul peroxidază — acid ascorbic, conform schemelor (SORU, 1959) A și B:



Schema B



Din aceste scheme reiese corelația posibilă de acțiune dintre vitaminele P și vitamina C. În scorbut și în alte afecțiuni carențiale nici una din aceste vitamine nu este total eficace. Dacă vitaminele P și vitamina C sunt administrate concomitent eficacitatea lor crește fiind îndepărtate simptomele afecțiunilor carențiale. În tratamentul scorbutului cu vitamina C, fenomenele hemoragice de la nivelul gingiilor, cele subcutanate și gastrointestinale scad numai după ce se administrează și vitamine P. Același efect s-a observat și în tratarea scorbutului experimental la cobai.

În organismele animale acțiunea vitaminelor P interferează cu sistemul oxidoreducător format din adrenalină — adenocrom, protejând oxidarea adrenalinei, care mărește rezistența vaselor capilare. În carență de vitamină P crește permeabilitatea capilară a tuturor țesuturilor, fapt ce concordă cu rezultatele experimentale efectuate cu vitamina P, care susțin că aceste vitamine micșorează permeabilitatea capilarelor și fragilitatea vaselor de sânge.

Specificitatea de acțiune a vitaminelor P este dependentă de structura moleculară a agliconului și a componentei glucidice. Experimental s-a demonstrat că substituirea unui metil de la unul din hidroxilii agliconului (hesperidină) scade activitatea vitaminică a respectivilor compuși. Fixarea legăturii glicozidice la C-3 nu modifică activitatea vitaminică, pe când legarea acesteia la C-7 o intensifică. Metoxilarea hidroxilului de la C-7 scade activitatea vitaminică, iar dubla legătură dintre C-2 și C-3 intensifică activitatea biochimică. Derivații care provin de la 2-fenilbenzopiran (croman) au de asemenea o activitate vitaminică mai intensă. Prezența a două grupări libere hidroxil în poziție orto una față de alta pe inelul fenilic C mărește de asemenea activitatea. Activitate vitaminică P au și unii antocianidoli și catecoli.

În ordine descrescândă, activitatea vitaminică P a unor glicozide este următoarea: cvercetol > luscolin > rutin > morin > cvercitrină > hesperidină > naringin.

18.3. PROPRIETĂȚI, METODE DE IDENTIFICARE ȘI DOZARE

Flavonoidele pot forma în celule sisteme de oxidoreducere reversibile cu rol însemnat în numeroase procese metabolice. Prin diferite reacții de oxidare, reducere, izomerizare etc., diferitele grupe de flavonoide se pot transforma reciproc una în alta, ceea ce constituie un mare avantaj pentru plante, realizându-se o bună utilizare a acestor pigmenți. Flavonele și flavanolii au spectre de absorbție caracteristice, cu maxime cuprinse între 240—270 nm și 320—380 nm.

Scanned with OKEN Scanner

Flavonele și derivații acestora formează cu metalele grele complecși stabili care contribuie pe de o parte la diversificarea nuanței culorilor în țesuturile în care se găsesc, iar pe de altă parte pot inactiva unele enzime din componența cărora au extras metalul respectiv.

Extracția vitaminelor P se face cu soluție apă-metanol, apă-butanol, acizi organici, hidrocarburi etc., uneori în mediu acid.

Separarea lor se face prin metode cromatografice, iar identificarea prin metode spectrofotometrice. Dacă se utilizează cromatografia în strat subțire sau pe hârtie după eluarea spoturilor se face pulverizarea acestora cu săruri de Al, Pb, Fe, Th, sau prin tratarea cu vapori de amoniac și dozarea (aprecierea) spoturilor în lumină ultravioletă.

Dozarea se bazează pe transformarea lor în forme, cianidinice puternic colorate.

Prin tratarea vitaminelor P în soluție alcoolică cu Mg metalic și HCl se obține o coloratie roșie, caracteristică cianidinelor.

În soluție alcalină concentrată, vitaminele P dau la încălzire o culoare galbenă, care virează spre roșu, datorită transformării flavonelor în chinone.

Cu perclorura de fier, vitaminele P dau o culoare verde, nespecifică, pe care o dau și ortodifenolii. Unele flavonoide (cvercetol) pot fi recunoscute și cu acidul boric, cu care formează complecși, care se pare că iau parte la diferențierea sexuală a unor animale inferioare.

Metodele biologice constau în determinarea permeabilității capilare și a fragilității vaselor sanguine prin diferite metode. Se urmărește modificarea sângelui venos după comprimarea vaselor, timpul de sângerare, timpul de coagulare, apariția petelor pe corp sub presiune redusă, utilizarea de coloranți și iritarea pielii etc.

18.4. RĂSPÂNDIRE ÎN NATURĂ, METABOLISM ȘI NECESITĂȚI

Vitamina P se găsește în organismele vegetale în proporții variabile. Există o mare asemănare între răspândirea vitaminei C și a vitaminei P în plantele superioare, cu toate că între conținutul vitaminei C și activitatea vitaminelor P nu există o relație cantitativă.

Bogate în vitamina P sunt fructele citrice, măcești, coacăzele negre, hrișca, tutunul etc. În general fructele au un conținut mai ridicat de vitamină P decât frunzele și rădăcinile, cu excepția pătrunjelului și a ceaiului (frunze). Vitaminele P se găsesc în natură predominant sub formă de glicozide, care servesc și ca sursă de rezervă pentru utilizarea flavonelor și a derivaților acestora în stare liberă, în diferite procese de oxidoreducere. În produsele alimentare de origine animală, cantitățile de vitamine P sunt extrem de reduse. Unii cercetători neagă prezența acestor vitamine în țesuturile animale. Ele pătrund totuși în organismele animale prin hrană.

Biogeneza vitaminelor P în plante se realizează în mod similar cu cea a antocianilor, folosindu-se ca produse inițiale diferite monoglucide și fenilpropan sau acid fenilacetic. Prin sinteză se pot obține din aldehidă salicilică și acetofenonă în prezența acidului clorhidric.

Absorbția vitaminelor P se realizează la nivelul intestinului subțire, unde glicozidele sunt probabil hidrolizate. Resorbția acestor vita-

Scanned with OKEN Scanner

mine se poate realiza şi la nivelul intestinului gros, întrucât administrarea rectală are acelaşi efect asupra rezistenţei capilare ca şi administrarea orală sau parentală. O bună parte din vitamina P eliminată prin bilă este resorbită din nou la nivelul intestinului, realizându-se astfel un circuit entero-hepato-enteric.

Aproximativ 70—80% din vitamina P ingerată se elimină prin urină, fapt ce demonstrează că această vitamină traversează organismul în cantitate însemnată.

Administrarea a 100 mg citrină intravenos la iepure este urmată de eliminarea urinară a 60% din cantitate în decurs de o oră.

Vitamina P se elimină prin urină în cantitate redusă sub formă liberă, neglicozidică şi predomină sub formă de metaboliţi. Administrarea per os la om şi animale a rutinei şi cvercitrinei s-a arătat că aceste vitamine sunt metabolizate în organism şi se elimină sub formă de metaboliţi cum sunt acizii 3,4-dihidroxifenilacetici, m-hidroxifenilacetici, acidul homovanilinic, care apar ca şi produşi de metabolizare a ardenalinei şi noradrenalinei (catecolamine), fapt ce reflectă corelaţii strânse între vitaminele P cu hormonii medulosuprarenali. Se pare că flavonele şi derivaţii acestora sunt substrate de acţiune a enzimelor care meabolizează catecolaminele, intrând în competiţie structurală cu acestea, pentru acelaşi sistem enzimatic. Datorită acestei inhibiţii competitive, vitaminele P „protejează" efectul şi activitatea colaminelor, micşorând cantitatea enzimelor care le inactivează prin metabolizare.

Unii autori susţin că vitamina P se găseşte în ţesuturile animale sub formă de complexe flavonoproteice, mai ales cu proteinele serice. Coloranţii flavonoidici în cursul traversării organismului sunt oxidaţi la formele chinonice, sub acţiunea unor peroxidaze. Flavochinonele pot fi reduse la formele fenolice sub acţiunea acidului ascorbic.

Observaţiile clinice susţin rolul important al vitaminelor P în nutriţia umană. Administrarea de hesperidină la bolnavii cu avitaminoză multiplă a determinat o creştere însemnată a rezistenţei capilare. În cazurile de scorbut uman, administrarea a 3 g de hesperidină măresc rezistenţa capilarelor până aproape de valorile normale.

Necesităţile pentru omul adult în vitamina P sunt apreciate la 200 mg/zi. După raportul ce există între vitamina C şi citrină în lămâie (suc), care este de 5 la 1 în favoarea acidului ascorbic, doza terapeutică necesară ar fi de 50 mg/zi, iar la cobai de 1 mg/zi.

18.5. ROL ŞI ACTIVITATE BIOCHIMICĂ

Vitaminele P au un rol important în organismele vegetale şi animale. Ele ajută vitamina C în prevenirea şi tratarea scorbutului, măresc tonusul miocardului, măresc rezistenţa la rupere a vaselor sanguine, scad presiunea arterială, micşorează permeabilitatea vaselor capilare etc.

Rutina determină vasodilataţie şi creşte totodată contractibilitatea miocardului, mai ales în stările de oboseală.

Experimental s-a demonstrat că prin administrare de rutină la oameni şi la animale de experienţă, se produce o creştere a rezistenţei capilare, prin mărirea tensiunii intracapilare, datorită capacităţii flavo-

Scanned with OKEN Scanner

noidelor de a inhiba oxidarea adrenalinei, proprietate pe care o are și vitamina C. Se știe că adrenalina mărește rezistența vaselor sanguine.

Un rol însemnat al vitaminelor P constă în participarea acestora ca transportori de hidrogen în procesele de oxidare celulară. Ele au o acțiune sinergică cu a vitaminei C în numeroase procese metabolice. Vitaminele P ajută, economisesc și protejează vitamina C în menținerea sistemului de oxidoreducere acid ascorbic — acid dehidroascorbic. Așa după cum s-a prezentat la mecanismul de acțiune (schemele A și B), vitaminele P participă cuplat cu vitamina C în diferite procese de oxidoreducere, mai ales la plantele superioare:

$$\text{Flavone reduse} + H_2O_2 \xrightarrow{\text{Peroxidază}} \text{Flavochinone} + H_2O$$

$$\text{Flavochinone} + \text{Acid ascorbic} \rightarrow \text{Flavone reduse} + \text{Acid dehidroascorbic}$$

Vitaminele P au de asemenea o acțiune antihialuronidazică și antihistaminică, care contribuie suplimentar la micșorarea permeabilității vaselor capilare. Ele stimulează transportul oxigenului prin capilare, influențează metabolismul apei și a electroliților prin creșterea diurezei.

Vitaminele P inhibă activitatea unor sisteme enzimatice (tirozindecarboxilaza, xantinoxidaza, succinoxidaza, glucozo-6-fosfataza etc.) iar în concentrații mari se comportă ca fitoncide, cu acțiuni antibacteriene și antivirale. În metabolismul proteinelor, vitaminele P restabilesc echilibrul albumine/globuline, dereglat în stări carențiale.

În metabolismul glucidic vitaminele P intervin prin scăderea acidului lactic din sânge (lactacidemie), probabil prin acțiunea ce o au asupra adrenalinei. După administrarea de vitamine P crește conținutul calciului sanguin.

Cvercitrina este capabilă să reducă cu 50% creșterea consumului de O_2 determinat de 1,2,4-dinitrofenol la șobolan.

Polifenoloxidazele din cartofi și fructe colorează citrina datorită formării de derivați chinonici, după tăietură proaspătă, fiind implicate în reacțiile de îmbrunare a fructelor și legumelor.

Metilcvercetolul se pare că este identic cu ginotermona, factorul feminizant al celulelor sexuale nediferențiate ale unor organisme vegetale inferioare, în special la alga verde *Chlamidomonas eugametos*. Se pare că sunt suficiente 5 molecule de metilcvercetol pentru a feminiza o celulă asexuată.

În frunzele de fasole s-a pus în evidență prezența unui pigment galben, format din unirea unei molecule de acid glucuronic cu o moleculă de cvercetol, numit cvercituronă, care are rol în transportul de oxigen. Cvercetolul se transformă în chinona corespunzătoare în prezența polifenoloxidazei și a O_2, iar acidul ascorbic reface structura fenolică a cvercetolului.

Vitaminele P inactivează toxina difterică, protejând cobaiul de intoxicația cu această toxină. Ele stimulează diviziunea celulară și creșterea unor organisme animale inferioare.

Scanned with OKEN Scanner

18.6. HIPOVITAMINOZE, HIPERVITAMINOZE, PRINCIPII TERAPEUTICE ȘI PREPARATE FARMACEUTICE

În stări carențiale ale vitaminei P se produce mărirea permeabilității capilare a tuturor țesuturilor, cu apariția purpurilor hemoragice, a hemoragiilor retiniene, intestinale, meningiene etc. Uneori este greu de stabilit carența vitaminei P, de aceea a acidului ascorbic. Astfel, în scorbut, unde alături de avitaminoza C există și o avitaminoză P, frecvența hemoragiilor intestinale scade numai după administrarea ambelor vitamine deficitare. Nici una dintre vitaminele C și P administrate separat nu vindecă scorbutul în întregime.

Purpura vasculară și anumite nefrite hemoragice apar în carență de vitamina P, iar prin tratamente cu această vitamină se obțin rezultate bune. Rezultate similare se obțin cu vitamina P și în tratarea pleureziilor, peritonite, endocardite, poliartrite etc.

Rolul de factor alimentar important care se atribuie vitaminelor P se justifică prin corelația foarte strânsă cu acțiunea vitaminei C, cu sinergismul de acțiune în sistemele de oxidoreducere din organism. Datorită acestui sinergism vitamina P se mai numește și vitamina C_2 sau vitamina satelit a acidului ascorbic.

Prin modificarea permeabilității capilare în perioada carențelor de vitamină P, se produce o infiltrație a țesuturilor cu lichide și proteine serice, fapt ce determină o scădere a raportului dintre albumine și globuline în serul sanguin. În cursul avitaminozelor P, conținutul albuminelor scade, iar cel al globulinelor crește. Întrucât cel mai important factor oncotic este albumina serică, a cărei presiune osmotică este de trei ori mai mare decât a globulinelor, se deplasează spre țesuturi apa de circulație. În ciroze, unde există un dezechilibru hidric, administrarea de vitamine P ameliorează net acest dezechilibru hidric, mărind diureza și micșorând infiltrația de lichide în pleură, peritoneu și țesuturi. Vitamina C nu acționează asupra acestor tulburări biochimice și fiziologice. Vitamina P nu intervine eficient în tratarea hematuriilor. Vitaminele P dau rezultate bune în asociere cu vitamina K în tratarea hemoragiilor. Unii cercetători fac o corelație între creșterea calcemiei, sub acțiunea vitaminelor P și ameliorarea timpului de coagulare, precum și cu creșterea numărului de trombocite.

Toxicitatea vitaminelor P este foarte redusă. Dozele mari sunt suportate fără modificări toxice, datorită eliminării masive a acestor vitamine prin urină. Dintre vitaminele P, hesperidina pură, administrată intravenos, provoacă frisoane și colaps. Hesperidina fiind insolubilă în apă, administrarea ei intravenoasă se face în soluții alcaline și probabil și mediul alcalin are efecte negative.

Relațiile dintre vitaminele P și C în procesele de oxidoreducere s-au prezentat în capitolele anterioare. Vitamina C reduce formele cetonice ale vitaminei P în forme fenolice.

Vitamina C este un factor sinergic în atenuarea simptomelor provocate de carența vitaminică P și invers. Vitamina P are o acțiune sinergică și cu adrenalina în ce privește micșorarea permeabilității vaselor sanguine.

Vitaminele P sunt indicate în tratarea afecțiunilor determinate de creșterea permeabilității și scăderea rezistenței vaselor de sânge, în hemoragii și fragilitate capilară, în diabet zaharat și în hemoragiile di-

Scanned with OKEN Scanner

feritelor organe. în afecțiuni dermice, urticarii cronice, psoriazis, prevenirea aterosclerozei etc.

Preparatele cu *rutină* (rutozid) se dau sub formă de comprimate (20 mg) sau fiole (80 mg rutină). Se administrează pentru scăderea permeabilității și fragilității vaselor sanguine, în afecțiuni hemoragice, colite, în terapia cu anticoagulanți etc.

Tarosin, preparat farmaceutic care conține 500 mg acid ascorbic, 20 mg rutină, asigură menținerea tonicității și permeabilității normale a vaselor de sânge. Se administrează în hemoragii, fragilitate capilară, hipertensiune arterială, ateroscleroză etc., pentru ameliorarea acestor afecțiuni.

Preparatul farmaceutic *Rutosid* (rutina) se prezintă ca o pulbere galbenă sau galben-verzuie, fără miros și fără gust, cu punct de topire la 190°C, cu descompunere. Este puțin solubil în apă și etanol, sensibil la lumină și este incompatibil cu substanțe cu reacție acidă. Soluțiile injectabile se prepară prin dizolvare în soluții apoase de propilenglicol.

Citrina (extrasă din suc de lămâie) este prezentă în farmacii în fiole a 75 mg sau drajeuri a 25 mg.

Rutina se găsește sub formă de tablete a 20 și 60 mg/tabletă.

Administrarea preparatelor farmaceutice se face predominant pe cale orală întrucât aproape toată cantitatea de vitamină P este absorbită în intestin.

Dozele terapeutice depind de gravitatea afecțiunilor, iar cele de prevenire, de întreținere a organismului variază între 20 și 100 mg/zi.

Scanned with OKEN Scanner

BIBLIOGRAFIE SELECTIVĂ

1. L. Ababei, M. Trandafirescu, *„Biochimie"* (partea I), *„Vitamine hidrosolubile cu rol coenzimatic"*, Lit. I.M.F. Iaşi, 1974.
2. J. N. Abelson, M. I. Simon, *"Methods in Enzymology"*, vol. 190, *"Retinoids"*, ed. Lester Packer, Academic Press INC San Diego etc., 1990.
3. P. N. Abelson, M. I. Simon, *"Methods in Enzymology"*, vol. 214, *„Carotenoids"*, ed. Lester Packer, Academic Press INC, San Diego etc., 1993.
4. H. Y. Almquist, A. Klose, J. Amer. Chem. Soc., **61**, 2557, 1939.
5. W. H. Amos, R. A. Neal, J. Biol. Chem., **245**, 5643, 1975.
6. A M. Baura, T. H. Singh, R. C. Das, Br. J. Nutr., **30**, 1 (1973).
7. D. Bedeleanu, I. Manta, *„Biochimie medicală şi farmaceutică"* Edit· Dacia Cluj-Napoca, 1985.
8. C. Bodea, V. Fărcăşan, E. Nicoară, H. Sluşanschi, *„Tratat de biochimie vegetală"*, vol. I, Edit. Acad. R.S.R., Bucureşti, 1964.
9. J. Bonner, J. E. Varner, *"Plant Biochemistry"*, Academic Press, New York and London, ed. III, 1976.
10. G. Britton, S. Liaaen—Jensen, H. Pfander, *"Carotenoids"*, vol. I, Edit. Birkhäuser Verlag, Basel, Boston, Berlin, 1995.
11. G. Britton, *"The biochemistry of natural pigments"*, Cambridge Univ. Press., Cambridge-1983.
12. G. O. Burr, M. M. Burr, J. Biol Chem., **82**, 345, 1959.
13. G. W. Butler, R W. Bailey, *"Chemistry and Biochemistry of Herbage"*, vol. 2, Academic Press London and New York, 1973.
14. L. Chiosa, M. Neuman' *„Vitamine şi antivitamine"*, Edit. Medicală, Bucureşti, 1956.
15. I. Ciulei, E. Grigorescu, U. Stănescu, *„Plante medicinale. Fitochimie şi Fitoterapie"*, vol. I şi II Edit Medicală, Bucureşti, 1993.
16. S. B· Colowick, N. O. Kaplan, *"Methods in Enzymology"*, vol. 67, *"Vitamins and Coenzimes"*, Academic Press, New York, London, Sydney, Toronto, 1980.
17. E. E. Conn, P. K. Stumf, *"Outlines of Biochemistry"*, ed. III, John Whiley and Sons Inc., New York, London, Sidney, Toronto, 1972.
18. W. D. Mc Corquodale, E. Binkley, W. R. Mekee, R. S. Trayer, H. Doisy, J. Biol. Chem., **130**, 219, 1939.
19. D. B. Mc Cormic, L. D. Wright, *"Methods in Enzymology"*, vol. 67, "Vitamins and coenzymes", Part F, Academic Press, New York, London, Toronto, Sydney, San Francisco, 1980.
20. F. Crăciun, O. Bojor, M. Alexan, *„Farmacia naturii"*, Edit, Ceres, Bucureşti, 1976.
21. E. Cristea—Popa, A. Popescu, E. Truţia, V. Dinu, *„Tratat de biochimie medicală"*, vol I, Edit. Medicală, Bucureşti, 1991 şi Mic tratat, 1996.
22. H. Dag, H. Grandos, I. Prange, Acta. Phisiol. Scand., **18**, 161 (1969).
23. H. Dam, Biochem. Z., **220**, 158, 1930.
24. H. Dam. A. Grieger, P. Karrer, Helv. Chim. Acta, **22**, 210 (1939).
25. T. M. Delvin, *"Textbook of Biochemistry with Clinical Correlations"* Second edition, Edit. John Wiley and Sons, 1986.
26. I. F. Dumitru, *„Vitamine"*, Tipo Univ. Bucureşti, 1970.
27. I. F. Dumitru, S. Mager, A. Turcu, *„Biochimie"*, Edit. Didactică şi Pedagogică, Bucureşti, 1973.

Scanned with OKEN Scanner

28. I. F. Dumitru, *„Biochimie"*, Edit. Didactică şi Pedagogică, Bucureşti, 1980.
29. A. L. Enescu, N. N. Oiţă, *„Bazele vitaminoterapiei"*, vol. I, Edit. Junimea Iaşi, 1990.
30. N. Fridge, S. Berger, *„Pfarmacopée Europenee"*, ed. II., Edit. Maisoneuve, 1983.
31. A. Gherghi, I. Burzo, L. Mărgineanu, S. Denes, M. Dobreanu, K. Pattantius *„Biochimia şi fiziologia legumelor şi fructelor"*, Edit. Acad. R.S.R. Bucureşti, 1983.
32. E. Grigorescu, I. Ciulei, U. Stănescu, *„Index Fitoterapeutic"*, Edit. Medicală Bucureşti, 1986.
33. T. W. Goodwin, *"Chemistry and Biochemistry of Plant Pigments"*, Academic Press, London and New York, 1976.
34. T. W. Goodwin, *"The Biochemistry of the Carotenoids"*, vol. I. Edit. Chapman and Hall, London and New York, 1980.
35. T. W. Goodwin, E. I. Mercer, *"Introduction to Plant Biochemistry"*, ed. II. Edit. Pergamon Press, Oxford etc., 1988.
36. I. Gonţea, *„Alimentaţia raţională a omului"*, Edit. Didactică şi Pedagogică Bucureşti, 1971.
37. J. Gross, P. Budowski, Biochem., J., **101**, 747, 1966.
38. J. Gross, *"Pigments in Vegetables"*, edit. Van Nostrand Reinhold, New York, 1991.
39. F. Hoffman La-Roche, Ltd. Basel, 1995.
40. D. R. Howten, S. Hoshimoto, Am. J. Clin. Nutr., **8**, 50, 1976.
41. P. Karrer, R. Morf, K. Schopp, Helv. Chim. Acta, **14**, 1036, 1931.
42. H. E. Keller, *"Analitical Methods for Vitamins and Carotenoids in Feed"*, Hoffman La-Roche, 1988.
43. E. Kodicek, D. E. Lawson, P. W. Wilson, Nature (London), **228**, 763 (1970).
44. F. Korte, M. Goto, *"Natural Compounds"*, Edit. G. Thieme, Stuttgart, San Francisco, London, Tokyo, 1977.
45. S. L. Lee, A. I. Scott, Anal. Biochem., **74**, 641, 1976.
46. A. L. Lehninger, *„Biochimie"*, Edit. Tehnică, vol. I, Bucureşti, 1987.
47. L. R. Lotal, E. D. Ong, F. Chytil, J. Natl. Cancer Inst., **64**, 1259, 1980.
48. H. F. De Luca, Fed. Proc., **28**, 1678, 1969.
47. M. Maayan, I. N. Rosenberg, Endocrinology, **82**, 209, 1968.
50. R. W. Mekee, E. Binkley, M. Corgnodale, R. A. Trager, A. E. Doisy, J. Am. Chem. Soc., **61**, 1295, 1939.
51. M. Matheus—Roth, Clin. Res. **28**, 477, 1980.
52. R. C. Moon, J. Nutr., 119, 1927, 1989.
53. D. W. Martin, P. A. Mayes, V. W. Rodwell, *"Harper's Review of Biochemistry"*, Lange Medical Publications, ed. 20, Los Alto, California, 1985.
54. G. Neamţu, *„Biochimie vegetală"*, Edit. Ceres, Bucureşti, 1981.
55. G. Neamţu, I. Popescu, St. Lazăr, I. Burnea, I. Brad, G. Câmpeanu, T. Galben, *„Chimie şi biochimie vegetală"*, Edit. Didactică şi Pedagogică, Bucureşti, 1983.
56. G. Neamţu, V. Tămaş, *„Pigmenţi carotenoidici şi metaboliţi"*, vol. II, Edit. Ceres, Bucureşti, 1986.
57. Gh. Neamţu, Gh. Câmpeanu, A. Enache, *„Dicţionar de biochimie vegetală"*, Edit. Ceres, Bucureşti, 1989.
58. Gh. Neamţu, Gh. Câmpeanu, C. Socaciu, *„Biochimie vegetală"*, Edit. Didactică şi Pedagogică, Bucureşti, 1993.
59. P. Netescheim, C. Snyder, M. I. Williams, V. M. Cone, C. J. Kim, Proc. Am. Assoc. Cancer Rer., **16**, 44, 1975.
60. S. Oeriu, *„Biochimie medicală"*, Edit. Didactică şi Pedagogică, Bucureşti, 1983.
61. J. A. Olson, J. Nutr. Sci. Vitaminol., **39**, 557, 1993.
62. A. T. Quick, Am. T. Physiol., **118**, 260, 1937.
63. "Roche", *"Analitical Proceduresfor the Determination of Vitamins in Multivitamin Preparation"*, Hoffman La-Roche, 1989.
64. E. A. Rogers, J. B. Herndon, M. Newberne, Cancer Res., **33**, 103, 1973.
65. D. Schachter, E. B. Dowdle, H. Schenker, Am. J. Physiol., **198**, 263, 1960.
66. M. Şerban, *„Biochimie medicală veterinară"* (ed. V. Tămaş şi col.) Edit. Didactică şi Pedagogică, Bucureşti, 1981.
67. K. Simons, Progr. Gastroenternal., **1**, 195, 1968.
68. K. L. Simpson, C. O. Chichester, Ann. Rev. Nutr., **1**, 351, 1981.
69. E. Soru, *„Biochimie medicală"*, vol. I, ed. II, Ed. Medicală, Bucureşti, 1959.
70. M. Sparthan, S. Chajkin, Analyt. Biochem., **31**, 286, 1969.
71. U. Stănescu, E. Savopol, *„Incompatibilităţi medicamentoase"*, Edit. Medicală, Bucureşti 1981.
72. C. Streffer, J. Benes, Euro J. Biochem., **21**, 357, 1971.

Scanned with OKEN Scanner

Redactor: ing. GEORGETA SĂBĂDEANU
Tehnoredactor: EUGENIA CERNEA

Bun de tipar: 20.XI.1996. Apărut: 1996.
Coli tipar: 27,75.

Comanda nr. 60449
Imprimeria „ARDEALUL" Cluj-Napoca
B-dul 21 Decembrie nr. 146
ROMÂNIA

Scanned with OKEN Scanner

ISBN 973-40-0376-3

ISBN 973-40-0377-1

Scanned with OKEN Scanner